

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADELIA GRZYBOWSKI



FITOLARVICIDAS PARA O CONTROLE DO VETOR DA DENGUE E FEBRE  
AMARELA, *Aedes aegypti*

CURITIBA  
2011

ADELIA GRZYBOWSKI

FITOLARVICIDAS PARA O CONTROLE DO VETOR DA DENGUE E FEBRE  
AMARELA, *Aedes aegypti*

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana  
Coorientador: Dr. Maurício Passos

CURITIBA  
2011

Grzybowski, Adelia

Fitolarvicidas para o controle do vetor da dengue e febre amarela, *Aedes aegypti* / Adelia Grzybowski – Curitiba, 2011.

145f.: il. (algumas color.); 29,7 cm

Orientador: Dr. José Domingos Fontana

Coorientador: Dr. Maurício Passos

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. *Annona muricata*. 2. *Piper nigrum*. 3. *Aedes aegypti*. 4. Acetogeninas. 5. Piperina. 6. Sinergismo. I. Título.

CDD 614.4323

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ADÉLIA GRZYBOWSKI**

**Título: FITOLARVICIDAS PARA O CONTROLE DO VETOR DA DENGUE E FEBRE AMARELA, *Aedes Aegypti***

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



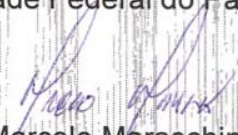
Prof. Dr. José Domingos Fontana  
Orientador



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Marcelo Maraschin  
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Eduardo Novaes Ramires  
Universidade Tuiuti do Paraná

Curitiba, 18 de novembro de 2011.



Aos meus pais, Tereza e Joaquim  
Aos meus irmãos, Vilma e Roberto  
À minha sobrinha Júlia

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo Dom da vida.

Ao meu orientador, Dr. José Domingos Fontana, por todas as oportunidades de crescimento, desafios propostos, pelas ideias geniais e oportunas colocações. Sobretudo por ser exemplo de cientista e servir de inspiração ao longo dos anos de convívio desde a iniciação científica.

Ao meu coorientador, Dr. Maurício Passos, pela colaboração e apoio desde o início da minha jornada no Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa.

À minha amiga e colega de laboratório, a doutoranda Marcela Tiboni, pela inestimável colaboração em todas as fases da pesquisa através dos inúmeros experimentos realizados e companheirismo incondicional. Pela capacidade de transpor esta amizade para fora do ambiente laboratorial, fazendo com que possamos ter a certeza de que podemos contar sempre com os amigos em quaisquer momentos da vida, bons e ruins.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de crescimento profissional, bem como ao Corpo Docente pelo conhecimento transmitido. Em especial à Dra Almeriane W. Santos pelo intercâmbio de informações científicas e por tornar os experimentos mais fáceis de executar. À Dra. Tania Maria Bordin Bonfim ao Dr. Roberto Pontarolo, pelos bons momentos de convivência e incentivo desde a graduação.

Ao Dr. Mário Antônio Navarro da Silva e sua equipe do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, pelo fornecimento dos ovos de *Aedes aegypti*, que foram fundamentais para a realização da tese e também pela troca de informações e incentivo durante o período. Agradeço em especial ao aluno Rodrigo Faïta Chitolina, que com muita dedicação conduziu a colônia Rockfeller para que o trabalho pudesse ser finalizado em tempo hábil.

À Dra. Francinete Ramos Campos pelas análises de espectrometria de massas da amostra de acetogeninas.

Ao Dr. Márcio Chimelli pela prontidão em sempre auxiliar com os registros fotográficos.

À Carolina Bueno Wandscheer e Jonny E. Duque Luna que transmitiram seus conhecimentos e me auxiliaram com os bioensaios com as larvas de *Aedes aegypti* no início da minha trajetória acadêmica, ainda como bolsista de Iniciação Científica pela CNPq.

Agradeço aos meus pais, Joaquim e Tereza, por me mostrarem que mais importantes que os títulos e riquezas materiais são os valores que recebemos e colocamos em prática, como a humildade, honestidade e trabalho árduo. Esta é a verdadeira educação recebida que fará a diferença.

Ao meu irmão, Roberto e minha cunhada Simone, pela convivência e incentivo à seguir em frente.

À minha irmã Vilma e meu cunhado Agroaldo, pelo incentivo diário e suporte mesmo a distância.

À minha sobrinha e afilhada Júlia, pelos sorrisos, encantos e ingenuidade transmitida nos momentos de carinho.

Aos meus amigos e colegas de turma do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial à Fernanda Gaensly pelas revisões

críticas dos artigos, à Cláudia Seidl e Monique A. Frazon pela disponibilidade na realização e discussão dos experimentos. E também à Paola Rosa Luz, Karina Bora e Dayse Fernanda de Souza por compartilharem os momentos de dúvidas e conquistas.

Aos meus amigos Érica Schulze, Lorena E. Graef, Gisele P. Leitão, Fernanda Tiboni, Ricardo T. Grzybowski, Lessandra M. Colmanetti, Mariana V. Santos, Sylvio Piva Jr., Fernanda L. Viganó, Leandro Friedemann, Mackelly Simionatto, Maria Helena Fonseca, Letícia Roveri e tantos outros, que me deram sempre apoio, me ouviram e compartilharam de momentos de alegria.

À Maria Angélica Choinski Tiboni, Irene P. Leitão e Mário J. G. Leitão pelas acolhidas sempre calorosas em suas casas nos mais diversos momentos desta trajetória e que por muitas vezes fizeram o papel de pais devido à distância que não permitia que os meus estivessem presentes fisicamente.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma de ajudaram e me incentivaram nesta etapa e execução desta tese, em especial ao Alexandre D. L. de Moraes, coordenador de Propriedade Intelectual da Agência de Inovação da UFPR, que com competência viabilizou o depósito do pedido de patente perante ao INPI.

“Qualquer trabalho que não lhe exija superação,  
não lhe proporcionará crescimento.

Qualquer trabalho que não lhe desafie,  
não lhe proporcionará crescimento.

Qualquer trabalho que não lhe faça sentir vontade de desistir em alguns  
momentos,  
não lhe proporcionará crescimento.

Qualquer trabalho que não lhe proporcione crescimento,  
simplesmente não serve.”

(Flávio Augusto da Silva)



## RESUMO

Uma alternativa para o controle do mosquito vetor da dengue e febre amarela, *Aedes aegypti*, foi explorada através de letalidade na fase larval provocada pela ação isolada ou combinada de fitolarvicidas e, neste segundo caso, de forma sinérgica. Para tal propósito, nove plantas da flora brasileira foram inicialmente avaliadas utilizando o bioensaio de citotoxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina*. Foram selecionadas as duas plantas mais promissoras: sementes de *Annona muricata* (graviola) e frutos de *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), tirando partido das respectivas substâncias químicas de maior bioatividade, acetogeninas e piperamidas. Pelo critério de economicidade, etanol foi eleito como solvente para a preparação dos extratos brutos e visando o enriquecimento das substâncias larvicidas, a cromatografia em coluna foi empregada. Tanto os extratos brutos quanto suas frações e subfrações mais ativas foram sistematicamente ensaiados contra larvas de 3<sup>o</sup> ínstar de *A. aegypti* utilizando o procedimento padrão da OMS – Organização Mundial de Saúde e progressivamente confirmando, na comparação com annonacina semi-purificada e padrão de piperina, aliada a análises espectrofotométricas e cromatográficas, a direta correlação da bioatividade fitolarvicida com o enriquecimento, respectivo, de acetogeninas no caso de graviola e de pelo menos de uma piperamida no caso da pimenta-do-reino. As CL<sub>50</sub> em µg/mL para larvas de *A. aegypti* após 24 h de exposição evoluíram, no caso de *A. muricata*, de 93,48 no extrato bruto para 3,58 na fração etanólica e para 1,73 na subfração acetato de etila:metanol 95:5. Comparativamente, as CL<sub>50</sub> foram de 1,84 para o extrato bruto de *P. nigrum*, 2,13 para a fração acetato de etila e 1,27 para a subfração clorofórmio:etanol 90:10. Já que os bioensaios preliminares com *A. salina* analisados através das metodologias do teste de independência e isoblograma/concentração total acusaram potencialização do efeito fitolarvicida quando da combinação de extratos etanólicos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum*, esta estratégia foi também explorada em larvas de *A. aegypti*. Um achado diferencial inicial foi que enquanto *P. nigrum* atua mais fortemente na potencialização contra *A. salina*, em larvas de *A. aegypti* deu-se o contrário, ou seja, o sinergismo das duas principais espécies químicas – acetogeninas e piperamidas – é dominado por *A. muricata*, ou seja, pelas acetogeninas. O sinergismo observado deve ser atribuído aos distintos mecanismos bioquímicos de ação das respectivas drogas: as acetogeninas bloqueando a respiração mitocondrial e a consequente biossíntese de ATP e as piperamidas, causando distúrbios neurológicos. Um resultado paralelo foi a notável alteração morfológica exibida pelas larvas. O extrato bruto de *P. nigrum*, mas não suas frações, decretou um encurtamento do abdômen e, portanto no tamanho total da larva. No caso do extrato bruto de *A. muricata*, que se repete nas frações, observa-se um efeito contrário, ou seja, alongamento do abdômen, bem como na parte anterior ao tórax, resultando em um efeito total de alongamento. Quando se bioensaiou combinações de *A. muricata* e *P. nigrum*, independentemente das proporções, os efeitos morfológicos da primeira se sobrepuseram.

Palavras-chave: *Annona muricata*. *Piper nigrum*. *Aedes aegypti*. Acetogeninas. Piperina. Sinergismo.

## ABSTRACT

The alternative control of the dengue and yellow fevers vector *Aedes aegypti* mosquito was achieved through the larval phase mortality provoked by the isolated or combined action of phytolarvicides, and, in the second case, as a synergistic way. Nine botanical species from the Brazilian flora were preliminarily evaluated for such a purpose, using the classic cytotoxicology bioassay with the microcrustacean *Artemia salina*. This led to the selection of the two most promising plants: *Annona muricata* seeds (soursop) and *Piper nigrum* fruits (black pepper), taking advantage of their respective more bioactive compounds, acetogenins and piperamides. Regarding an economicity criterium, ethanol was selected as solvent for the preparation of crude extracts and looking for the enrichment of the most larvicidal components column chromatography was carried out. Either the crude extracts or their fractions and subfractions were systematically assayed against 3<sup>rd</sup> instar *A. aegypti* larvae using the WHO – World Health Organization standard protocol and confirming, progressively, using semi-purified annonacin and a piperine standard, by spectrophotometric and chromatographic analyses, direct correlation between the phytolarvicidal bioactivity and the respective enrichments of polar acetogenins in soursop case, and, at least, of one piperamide in the case of black pepper. The CL<sub>50</sub>, in µg/mL for *A. aegypti* larvae after 24 h exposition improved, in the *A. muricata* case, from 93.48 in the crude extract, to 3.58 in the ethanolic fraction and to 1.73 in the ethyl acetate : methanol 95:5 subfraction. Comparatively, the CL<sub>50</sub> were 1.84 for the crude extract from *P. nigrum*, 2.13 for the ethyl acetate fraction and 1.27 for the chloroform: ethanol 90:10 subfraction. Once the preliminary bioassay with *A. salina* analysed with the methodologies of independence test and total concentrations / isobolograms have indicated potentialization of the phytolarvicidal effect when the extracts of both *A. muricata* and *P. nigrum* were combined, this strategy was further full explored in *A. aegypti* larvae, too. A differential finding was discovered : while *P. nigrum* acted more strongly against *A. salina*, an opposite effect was seen in *A. aegypti* larvae, namely, the synergism or superadditivity from the two main chemical species – acetogenins and piperamides – was dominated by *A. muricata*, and hence, by the acetogenins. The observed synergism must be attributed to the distinct biochemical action mechanisms of the respective drugs: acetogenins blocking the mitochondrial respiration at the complex I and thus the consequent biosynthesis of ATP and piperamides provoking neurological disturbs. A parallel and unforeseen result was the remarkable morphological alteration displayed by the larva. The *P. nigrum* crude extract but not their fractions, resulted in abdomen shortening and hence in the whole larvae size. *A. muricata* crude extract as well as its fractions, conversely, resulted in abdomen and thorax anterior part enlargements, and hence, a total larvae size increase. When combinations of both extracts were bioassayed, irrespective to the combination proportions, the typical morphological effects of *A. muricata* resulted dominant.

Keywords: *Annona muricata*. *Piper nigrum*. *Aedes aegypti*. Acetogenins. Piperine. Synergism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - PAÍSES E ÁREAS DE RISCO DA TRANSMISSÃO DE DENGUE, 2000-2006 .....	25
FIGURA 2 - CÉLULA DO VETOR <i>Aedes aegypti</i> INFECTADA COM O VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO DEN-2 .....	26
FIGURA 3 - FORMAS DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE E AS SUAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	27
FIGURA 4 - DIFERENCIAÇÃO ENTRE O PERNILONGO DOMÉSTICO <i>Culex quinquefasciatus</i> (A) E O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> (B) .....	32
FIGURA 5 - DESENVOLVIMENTO DE OVO A PUPA DO <i>Aedes aegypti</i> .....	33
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DO <i>Aedes aegypti</i> .....	34
FIGURA 7 - OVOS DO <i>Aedes aegypti</i> .....	35
FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DA N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) .....	36
FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS INSETICIDAS QUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS (a) E PIRETRÓIDES (b) .....	37
FIGURA 10 - FRUTOS, FLORES E FOLHAS DE <i>Annona muricata</i> .....	38
FIGURA 11 - ESTRUTURA GERAL DAS ACETOGENINAS .....	39
FIGURA 12 - PRINCIPAIS ACETOGENINAS ENCONTRADAS NAS SEMENTES DE <i>Annona muricata</i> .....	41
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DA <i>Ilex paraguariensis</i> .....	42
FIGURA 14 - ESTRUTURA DAS METILXANTINAS CAFEÍNA, TEOFILINA E TEOBROMINA .....	43
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DE <i>Melia azedarach</i> .....	44
FIGURA 16 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE UM LIMONÓIDE E DA AZADIRACTINA A .....	45
FIGURA 17 - FOLHAS DE <i>Nicotiana tabacum</i> .....	46
FIGURA 18 - ESTRUTURA QUÍMICA DA NICOTINA .....	46
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO DO <i>Origanum vulgare</i> .....	47
FIGURA 20 - ESTRUTURA QUÍMICA DO p-CIMENO E SEUS DERIVADOS FENÓLICOS CARVACROL E TIMOL .....	47
FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO DE <i>Piper nigrum</i> .....	49
FIGURA 22 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PIPERINA E ISOBUTILAMIDAS RELACIONADAS .....	50
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO DO <i>Plumbago capensis</i> .....	51
FIGURA 24 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PLUMBAGINA .....	52

FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO DA <i>Tabebuia avellanedae</i> .....	52
FIGURA 26 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS BENZENÓIDES MENADIONA, $\beta$ - LAPACHONA E LAPACHOL .....	53
FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO DE <i>Thymus vulgaris</i> .....	54
FIGURA 28 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS .....	59
FIGURA 29 - TESTE DE LETALIDADE EM NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> ....	63
FIGURA 30 - ESQUEMA DOS BIOENSAIOS COM LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	65
FIGURA 31 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	66
FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO DO ISOBOLOGRAMA .....	69
FIGURA 33 - REPRESENTAÇÃO DO GRÁFICO DE LOG (z) VERSUS PROPORÇÃO DO EXTRATO MENOS ATIVO.....	71
FIGURA 34 - RENDIMENTOS DOS FRACIONAMENTOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS .....	73
FIGURA 35 - ATIVIDADE DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICA CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	77
FIGURA 36 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E AMOSTRA DE ACETOGENINAS POLARES DAS SEMENTES DE <i>Annona muricata</i> E PIPERINA	79
FIGURA 37 - COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.	80
FIGURA 38 - LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> CONTROLES E TRATADAS COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Annona muricata</i> E ACETOGENINAS POLARES.....	81
FIGURA 39 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM ACETOGENINAS POLARES E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Annona muricata</i> .....	83
FIGURA 40 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Annona muricata</i> E SUAS FRAÇÕES, trioleína e ACETOGENINAS POLARES .....	84
FIGURA 41 - ESPECTROS DE VARREDURA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Annona muricata</i> E A AMOSTRA DE ACETOGENINAS POLARES.....	85
FIGURA 42 - Relação entre ABSORBÂNCIA E ATIVIDADE EM NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> DO EXTRATO ETANÓLICO E BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Annona muricata</i> e ACETOGENINAS POLARES	86
FIGURA 43 - RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO E MORTALIDADE DE NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> DAS SUBFRAÇÕES DA FRAÇÃO ETANOL DO EXTRATO BRUTO DE <i>Annona muricata</i> .....	87
FIGURA 44 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS SUBFRAÇÕES DE <i>Annona muricata</i> .....	88



FIGURA 45 - HISTOGRAMA DAS ÁREAS DAS BANDAS DAS AMOSTRAS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL E SUBFRAÇÕES DE <i>Annona muricata</i> .....	89
FIGURA 46 - CONTEÚDO DE ACETOGENINAS QUANTIFICADO POR DENSITOMETRIA RELACIONADO COM OS VALORES DE CL <sub>50</sub> EM LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL E Am-SB2 DE <i>Annona muricata</i> .....	91
FIGURA 47 - LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> controles e TRATADAS COM O EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL, SUBFRAÇÃO Am-SB2 E ACETOGENINAS POLARES DE <i>Annona muricata</i> .....	92
FIGURA 48 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM ACETOGENINAS POLARES, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL E Am-SB2 DE <i>Annona muricata</i> .....	93
FIGURA 49 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO de <i>Piper nigrum</i> , piperina e trioleína .....	95
FIGURA 50 - ESQUEMA DO CITOCROMO P450.....	96
FIGURA 51 - LARVAS DE <i>A. aegypti</i> TRATADAS COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Piper nigrum</i> , PIPERINA E CONTROLES.....	96
FIGURA 52 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM PIPERINA E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Piper nigrum</i> .....	98
FIGURA 53 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Piper nigrum</i> E SUAS FRAÇÕES, TRIOLEÍNA E piperina .....	99
FIGURA 54 - ESPECTROS DE VARREDURA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. nigrum</i> E O PADRÃO DE PIPERINA.....	100
FIGURA 55 – RELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO relativo DE PIPERINA E ATIVIDADE EM NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> DO EXTRATO ETANÓLICO E BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Piper nigrum</i> E O PADRÃO DE PIPERINA .....	101
FIGURA 56 - RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO E atividade em NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> DAS SUBFRAÇÕES DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO BRUTO DE <i>Piper nigrum</i> .....	102
FIGURA 57 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS SUBFRAÇÕES DE <i>Piper nigrum</i> .....	103
FIGURA 58 - RELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO DE PIPERINA E ATIVIDADE EM NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> DAS SUBFRAÇÕES DE <i>Piper nigrum</i> .....	104
FIGURA 59 - LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> CONTROLES E TRATADAS COM O EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, SUBFRAÇÃO Pn-SB5 DE <i>P. nigrum</i> E PIPERINA .....	105

FIGURA 60 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM PIPERINA, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E SUBFRAÇÃO Pn-SB5 DE <i>Piper nigrum</i> .....	106
FIGURA 61 - MORTALIDADES ESPERADAS E OBSERVADAS DOS NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> ATRAVÉS DAS COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> .....	108
FIGURA 62 - ISOBOLOGRAMA DAS INTERAÇÕES LARVICIDAS EM <i>Artemia salina</i> ENTRE OS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> EM DIFERENTES PROPORÇÕES .....	110
FIGURA 63 - LOG DA CONCENTRAÇÃO TOTAL <i>VERSUS</i> PROPORÇÃO DE <i>Annona muricata</i> EM DIFERENTES COMBINAÇÕES CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	112
FIGURA 64 - MORTALIDADES ESPERADAS E OBSERVADAS DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> ATRAVÉS DAS COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> .....	114
FIGURA 65 - ISOBOLOGRAMA DAS INTERAÇÕES LARVICIDAS EM <i>Aedes aegypti</i> ENTRE OS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> EM DIFERENTES PROPORÇÕES .....	115
FIGURA 66 - LOG DA CONCENTRAÇÃO TOTAL <i>VERSUS</i> PROPORÇÃO DE <i>Annona muricata</i> EM DIFERENTES COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA <i>Aedes aegypti</i> .....	117
FIGURA 67 - LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> APÓS DIVERSOS TRATAMENTOS .....	118
FIGURA 68 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM OS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> SEPARADAMENTE E EM COMBINAÇÕES .....	120
FIGURA 69 - RELAÇÃO DAS MEDIDAS TÓRAX PELA CABEÇA DAS DIFERENTES COMBINAÇÕES LARVICIDAS .....	120

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FÓRMULA DA ÁGUA DO MAR ARTIFICIAL .....	62
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE AZUL DE METILENO .....	63
TABELA 3 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS .....	72
TABELA 4 - EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS E FRAÇÕES DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS AVALIADOS CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	75
TABELA 5 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DAS SEMENTES DE <i>Annona muricata</i> E AMOSTRA DE ACETOGENINAS POLARES PARA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> E LARVAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>Aedes aegypti</i> .....	78
TABELA 6 - MEDIDAS DAS LARVAS de <i>Aedes aegypti</i> controles E TRATADAS COM ACETOGENINAS POLARES E O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>annona muricata</i> .....	82
TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES LETAIS Das frações dO EXTRATO BRUTO DE <i>Annona muricata</i> CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> ...	83
TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DAS SUBFRAÇÕES DA FRAÇÃO ETANOL DO EXTRATO BRUTO DE <i>Annona muricata</i> CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	90
TABELA 9 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL E SUBFRAÇÃO Am-SB2 DE <i>Annona muricata</i> CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	90
TABELA 10 - MEDIDAS DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> CONTROLES E TRATADAS COM ACETOGENINAS POLARES, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL, SUBFRAÇÃO Am-SB2 DE <i>Annona muricata</i> .....	92
TABELA 11 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS Dos DE <i>Piper nigrum</i> E da piperina PARA NÁUPLIOS DE <i>Artemia Salina</i> E LARVAS DE 3º ÍNSTAR DE <i>Aedes aegypti</i>	94
TABELA 12 - MEDIDAS DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> TRATADAS COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Piper nigrum</i> , PIPERINA E CONTROLES.....	97
TABELA 13 - CONCENTRAÇÕES LETAIS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DE <i>Piper nigrum</i> CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	98
TABELA 14 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DAS SUBFRAÇÕES DA FRAÇÃO ETANOL DO EXTRATO BRUTO DE <i>Piper nigrum</i> CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	103
TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DA PIPERINA, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E	

SUBFRAÇÃO Pn-SB5 DE <i>Piper nigrum</i> CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	104
TABELA 16 - MEDIDAS DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> CONTROLES E TRATADAS COM PIPERINA, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E Pn-SB5 DE <i>Piper nigrum</i> .....	106
TABELA 17 - COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona Muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> AVALIADAS ATRAVÉS DO TESTE DE INDEPENDÊNCIA ( $\chi^2$ ) CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	107
TABELA 18 - CL <sub>50</sub> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> AVALIADOS SEPARADAMENTE E EM DIFERENTES COMBINAÇÕES CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	109
TABELA 19 - VALORES NUMÉRICOS DE A E CONCENTRAÇÕES TOTAIS EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> CONTRA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	111
TABELA 20 - COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> AVALIADAS ATRAVÉS DO TESTE DE INDEPENDÊNCIA ( $\chi^2$ ) CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	113
TABELA 21 - CL <sub>50</sub> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> AVALIADOS SEPARADAMENTE E EM DIFERENTES COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA <i>Aedes aegypti</i> .....	114
TABELA 22 - VALORES NUMÉRICOS DE A E CONCENTRAÇÕES TOTAIS EM COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	116
TABELA 23 - MEDIDAS DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> CONTROLES E TRATADAS COM OS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> SEPARADAMENTE E EM DIFERENTES COMBINAÇÕES.....	119
TABELA 24 - CL <sub>99</sub> E DOSES DIAGNÓSTICAS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> INDIVIDUALMENTE E EM COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	121
TABELA 25 - EXEMPLOS DE QUANTIDADES NECESSÁRIAS DAS ESPÉCIES BOTÂNICAS PARA A UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS INDIVIDUALMENTE E EM COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> E O FATOR DE SINERGISMO RELACIONANDO AS DOSES INDIVIDUAIS E COMBINADAS .....	122



## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>μL</b>	- microlitro
<b>μg/mL</b>	- micrograma por mililitro
<b>χ<sup>2</sup></b>	- chi-quadrado
<b>A</b>	- Valor numérico de A
<b>Ac.</b>	- Acetato
<b>adp.</b>	- Adaptado
<b>AE</b>	- Acetato de etila
<b>Am</b>	- <i>Annona muricata</i>
<b>CCD</b>	- Cromatografia em Camada Delgada
<b>CG</b>	- Cromatografia Gasosa
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	- Clorofórmio
<b>CL</b>	- Concentração letal
<b>CLAE</b>	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>Comb.</b>	- Combinação
<b>CYP450</b>	- Citocromo P450
<b>DD</b>	- Dose diagnostica
<b>DEN</b>	- Sorotipos do vírus da dengue
<b>DMSO</b>	- Dimetilsulfóxido
<b>EC</b>	- Eletroforese Capilar
<b>EtOH</b>	- Etanol
<b>Ext.</b>	- Extrato
<b>Fr.</b>	- Fração
<b>GL</b>	- Graus de liberdade
<b>IOC</b>	- Instituto Oswaldo Cruz
<b>MeOH</b>	- Metanol
<b>n</b>	- Número de amostras
<b>OMS</b>	- Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	- Organização Pan-Americana de Saúde
<b>pAG</b>	- amostra referência de acetogeninas polares
<b>Pn</b>	- <i>Piper nigrum</i>

<b>ppm</b>	- Parte por milhão (ou $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Rf</b>	- Fator de retenção
<b>RMN</b>	- Ressonância Magnética Nuclear
<b>RPM</b>	- Rotações por minuto
<b>SB</b>	- Subfração
<b>TAG</b>	- Triacilgliceróis
<b>THI</b>	- Tetrahydrofurano
<b>Zadd</b>	- Concentração total aditiva (esperada)
<b>Zt</b>	- Concentração total (encontrada)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL .....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
3.1	DENGUE .....	25
3.2	FEBRE AMARELA.....	29
3.3	<i>Aedes aegypti</i> .....	30
3.4	MÉTODOS DE CONTROLE DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS.....	35
3.5	ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE DO <i>Aedes aegypti</i> .....	37
3.5.1	<i>Annona muricata</i> .....	38
3.5.2	<i>Ilex paraguariensis</i> .....	42
3.5.3	<i>Melia azedarach</i> .....	44
3.5.4	<i>Nicotiana tabacum</i> .....	46
3.5.5	<i>Origanum vulgare</i> .....	47
3.5.6	<i>Piper nigrum</i> .....	48
3.5.7	<i>Plumbago capensis</i> .....	51
3.5.8	<i>Tabebuia avellanedae</i> .....	52
3.5.9	<i>Thymus vulgaris</i> .....	54
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>55</b>
4.1	OBTENÇÃO DAS ESPÉCIES E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA .....	55
4.1.1	<i>Annona muricata</i> .....	55
4.1.2	<i>Ilex paraguariensis</i> .....	55
4.1.3	<i>Melia azedarach</i> .....	56
4.1.4	<i>Nicotiana tabacum</i> .....	56
4.1.5	<i>Origanum vulgare</i> .....	56
4.1.6	<i>Piper nigrum</i> .....	57
4.1.7	<i>Plumbago capensis</i> .....	57
4.1.8	<i>Tabebuia avellanedae</i> .....	57
4.1.9	<i>Thymus vulgaris</i> .....	57
4.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES.....	58

4.2.1	Trituração das partes botânicas.....	58
4.2.2	Obtenção dos extratos etanólicos brutos.....	58
4.2.3	Fracionamento dos extratos etanólicos brutos .....	59
4.2.4	Subfracionamento das frações que apresentaram as melhores atividades frente aos náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	60
4.3	COMPOSTOS E AMOSTRAS DE REFERÊNCIA PARA OS BIOENSAIOS E METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	60
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DAS ESPÉCIES SELECIONADAS.....	61
4.4.1	Cromatografia em Camada Delgada .....	61
4.4.2	Espectrofotometria no UV-Vis.....	62
4.5	TESTE DE LETALIDADE EM NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	62
4.6	BIOENSAIOS COM LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	64
4.6.1	Obtenção das larvas .....	64
4.6.2	Determinação da atividade larvicida .....	64
4.6.3	Análise morfológica .....	65
4.7	COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS E ANÁLISE DAS INTERAÇÕES .....	67
4.7.1	Teste de independência ( $\chi^2$ ).....	67
4.7.2	Isoblograma/ concentração total.....	68
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1	SELEÇÃO DAS ESPÉCIES BOTÂNICAS.....	72
5.1.1	Rendimento dos extratos etanólicos brutos e frações .....	72
5.1.2	Teste de letalidade em náuplios de <i>Artemia salina</i> das diferentes espécies botânicas .....	74
5.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS, CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DE <i>Annona muricata</i> .....	77
5.2.1	Extrato etanólico bruto de <i>Annona muricata</i> .....	77
5.2.2	Frações e subfrações do extrato etanólico bruto de <i>Annona muricata</i> ..	83
5.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS, CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DE <i>Piper nigrum</i> . 93	
5.3.1	Extrato etanólico bruto de <i>Piper nigrum</i> .....	93
5.3.2	Frações e subfrações do extrato etanólico bruto de <i>Piper nigrum</i> .....	98
5.4	ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DAS COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE <i>Annona muricata</i> E <i>Piper nigrum</i> .....	107
5.4.1	Combinação dos extratos contra <i>Artemia salina</i> .....	107
5.4.2	Combinação dos extratos contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	113



<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>127</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>138</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos são importantes vetores na transmissão de doenças, dentre eles o *Aedes aegypti*, transmissor da dengue e da febre amarela, tanto no Brasil quanto em outros países de clima tropical. O *A. aegypti* é originário do Egito e espalhou-se pelas regiões tropicais e sub-tropicais do planeta desde o século XVI, período das Grandes Navegações. No Brasil, os primeiros relatos de dengue datam do final do século XIX, iniciando assim um grande problema de saúde pública no País. Neste contexto, o pesquisador Antonio Gonçalves Peryassú do atual Instituto Oswaldo Cruz (IOC) fez importantes descobertas sobre o ciclo de vida, hábitos e a biologia do *A. aegypti*, dados fundamentais que levaram à erradicação do mosquito em território nacional nas décadas seguintes. Porém, devido a outros países da América do Sul e Central não conseguirem completa erradicação, e também por um relaxamento das medidas de controle no Brasil, houve uma re-infestação nos anos 60, com a volta de registros de febre da dengue no País (CONSOLI, 1994; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; FIOCRUZ, 2011a; URDANETA-MARQUEZ, 2011).

A dengue é uma doença viral, que tem como agente causador um arbovírus, com quatro diferentes sorotipos, DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. A transmissão ocorre quando a fêmea da espécie vetora se contamina ao picar um indivíduo infectado na fase virêmica da doença. Uma vez infectado, *A. aegypti* é capaz de transmitir a doença enquanto viver (BRASIL, 2001; GUZMÁN, 2002; FIOCRUZ, 2011a; OCAMPO, 2011). A febre amarela é outra doença viral febril aguda de curta duração encontrada em países da África e das Américas Central e do Sul (BRASIL, 1999; MASSAD, 2001). Assim como na dengue, a transmissão se faz através da picada de mosquitos. A febre amarela já foi um dos maiores problemas da saúde pública nacional porém, devido a uma campanha iniciada em 1916 pela Fundação Rockefeller que levou a erradicação do principal mosquito vetor, *Aedes aegypti*, e também pelo desenvolvimento da vacina, desde então são poucos os casos relatos da doença (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

O mosquito *A. aegypti* espalhou-se rapidamente por todo País e, com a cocirculação dos diferentes sorotipos, ocorre o favorecimento dos casos de síndrome do choque da dengue, conhecida como febre hemorrágica, sendo esta

muito mais grave. Em janeiro de 2011 o Brasil confirmou a re-introdução do sorotipo DEN-4, confirmando a cocirculação dos quatro diferentes sorotipos no país (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; FIOCRUZ, 2011b).

O controle da disseminação das doenças relacionadas a esse mosquito está relacionado ao controle dos *criadouros* do mosquito, impedindo que os ovos cheguem à fase adulta, uma vez que o *A. aegypti* é um mosquito doméstico de hábitos oportunistas que vive dentro e ao redor dos domicílios ou em locais com bastante movimentação de pessoas, como estabelecimentos comerciais, escolas, igrejas e outros (JANSEN, 2010; FIOCRUZ, 2011a). E, portanto, o incentivo por parte do governo é reduzir o número de focos onde as fêmeas adultas depositem seus ovos, locais com água parada, reduzindo assim a população mosquitos adultos (BRASIL, 2001). Outra estratégia do país está baseada na utilização de inseticidas químicos, como organofosforados e piretróides, porém a resistência desenvolvida por algumas cepas do mosquito está favorecendo o aumento gradativo na quantidade de adultos e conseqüentemente ao aumento no número de casos de dengue no país (LIMA, 2003; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; LUNA, 2004; MACORIS, 2007; MELO-SANTOS, 2010).

Entretanto, métodos alternativos de controle do vetor precisam ser pesquisados utilizando plantas que possuem bioativos com efeitos tóxicos para insetos, explorando a biodiversidade de espécies encontradas no território brasileiro. Neste sentido, óleos essenciais e extratos de plantas são potenciais fontes de compostos com atividade tóxica para o controle dos mosquitos vetores da dengue e febre amarela, além de muitos ainda serem potencialmente repelentes (GILLIJ, 2008). No enfoque mais amplo, o uso de maneira combinada dos extratos de duas ou mais plantas pode servir como alternativa no combate ao *A. aegypti*, pois pode levar a um efeito larvicida maior, já que as plantas possuem metabólitos secundários com mecanismos bioquímicos de ação diferentes e então atuantes negativamente no ciclo morfogênético do inseto, *per se*, de maneira satisfatória e ainda mais eficazmente se combinadas, ou seja, contemplando sinergismo ou superaditividade de ação. Este foi o foco principal desta tese.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Desenvolver fitolarvicidas de plantas nativas ou exóticas encontradas no Brasil a partir de seus respectivos extratos etanólicos brutos e fracionados, bem como empregar combinações de tais extratos contra larvas de *Aedes aegypti*, mosquito vetor das febres da dengue e amarela.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- = Selecionar espécies de plantas nativas ou exóticas encontradas no território brasileiro (e.g. *Piper nigrum*, *Annona muricata* e outras) com potencial atividade larvicida;
- = Obter os extratos etanólicos brutos das plantas e fracioná-los através de técnicas cromatográficas;
- = Avaliar os extratos brutos das plantas e suas frações preliminarmente frente aos náuplios de *Artemia salina* a fim de selecionar os extratos e/ou frações mais potentes;
- = Subfracionar as frações que apresentarem as melhores atividades citotóxicas frente aos náuplios de *Artemia salina*;
- = Caracterizar os extratos etanólicos brutos e fracionados das espécies com maior atividade em *Artemia salina* de acordo com seus prováveis grupos de metabólitos ativos, por diferentes metodologias analíticas (e.g. Cromatografia em Camada Delgada-CCD e Espectrofotometria);
- = Avaliar a bioatividade dos extratos etanólicos brutos e das frações selecionadas frente à *Aedes aegypti* e analisar as larvas morfológicamente;
- = Formular combinações a partir dos extratos e avaliar a bioatividade contra náuplios de *Artemia salina* e larvas de *Aedes aegypti*, bem como a presença ou ausência de efeitos sinérgicos dos fitolarvicidas através dos métodos estatísticos teste de independência e isoblograma/ concentração total.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 DENGUE

A dengue é uma doença viral, que tem como agente causador um arbovírus, com quatro sorotipos, do gênero *Flavivírus* da família *Flaviviridae*. A doença é transmitida por artrópodes principalmente o mosquito *Aedes aegypti* e secundariamente pelo *Aedes albopictus* (GUZMÁN, 2002). É uma enfermidade característica de áreas tropicais e subtropicais, onde as condições do ambiente favorecem o desenvolvimento dos vetores (JANSEN, 2010), como demonstrado na FIGURA 1:



FIGURA 1 - PAÍSES E ÁREAS DE RISCO DA TRANSMISSÃO DE DENGUE, 2000-2006

FONTE: (OMS, 2006)

NOTA: Pontos vermelhos mostrando a extensão geográfica da dengue, 2000-2006, e as áreas em laranja representando maior risco de transmissão da doença.

A dengue apresenta um ciclo epidemiológico principalmente urbano, e a capacidade de transmissão é maior em áreas mais populosas, nos quais os humanos são os hospedeiros e o mosquito é o vetor. A transmissão ocorre quando a fêmea da espécie vetora se contamina ao picar um indivíduo infectado na fase virêmica da doença. O vírus multiplica-se no intestino médio do mosquito e infecta outros tecidos, como pode ser visto na FIGURA 2, chegando finalmente às glândulas salivares. Uma vez infectado, após um período de 10 a 14 dias, o *A. aegypti* é capaz de transmitir a doença enquanto viver (aproximadamente 30 dias). Não existe

transmissão da doença através do contato entre indivíduos doentes e pessoas saudáveis (BRASIL, 2001; FIOCRUZ, 2011a; OCAMPO, 2011).

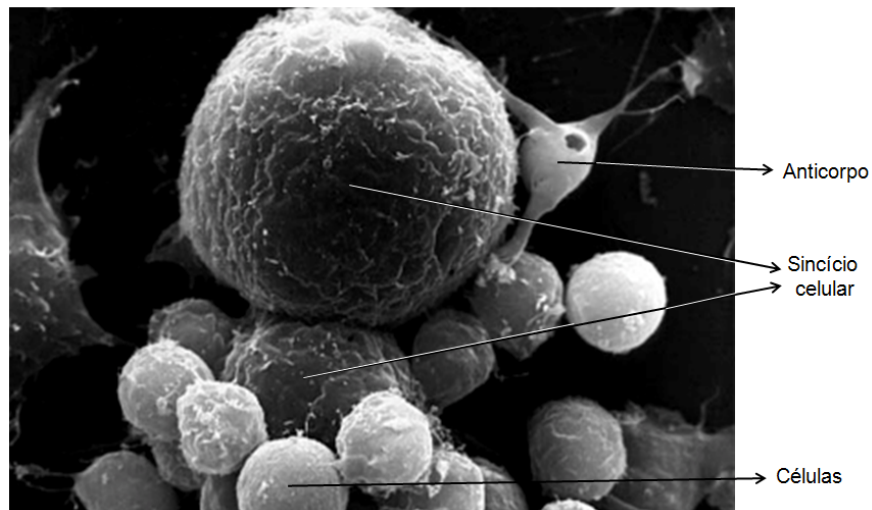


FIGURA 2 - CÉLULA DO VETOR *Aedes aegypti* INFECTADA COM O VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO DEN-2

FONTE: (FIOCRUZ, 2011a)

NOTA: As células contaminadas com o arbovírus sorotipo 2 tendem a se fundir formando um grande sincício (massa de citoplasma contendo vários núcleos envolvidos por uma única membrana plasmática). Várias pequenas células são montadas devido à presença do anticorpo anexo.

O arbovírus pode causar epidemias sérias, as quais constituem um dos maiores problemas de saúde pública no país. São conhecidos quatro sorotipos diferentes (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) que podem causar a dengue clássica, dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue, conhecido por febre hemorrágica. A infecção por um destes sorotipos causa imunidade permanente para o mesmo sorotipo, mas somente imunidade parcial e temporária contra os outros três. As manifestações clínicas e as formas de infecção do vírus da dengue podem ser visualizadas na FIGURA 3 (JACOBS, 2005).

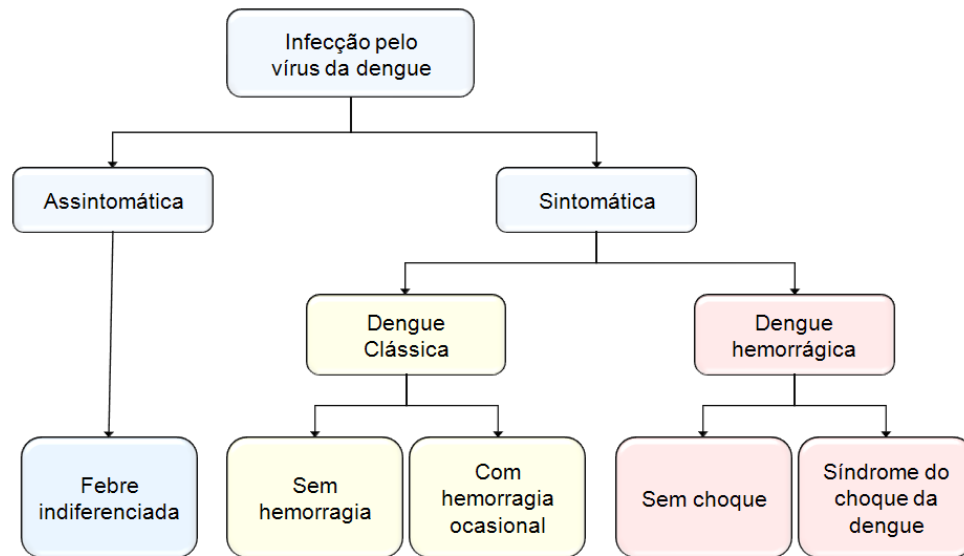


FIGURA 3 - FORMAS DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE E AS SUAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS  
FONTE:adp. (JACOBS, 2005)

A dengue na sua forma clássica pode ser assintomática ou sintomática, e se inicia com o ciclo de replicação viral nas células estriadas, lisas, fibroblastos e linfonodos locais, ocorrendo à chamada viremia, com a disseminação do vírus no organismo do indivíduo. Os primeiros sintomas como febre, dor de cabeça e mal-estar surgem após um período de incubação que pode variar de 2-10 dias, seguindo com intensas dores musculares e articulares. Nesta forma a letalidade é baixa, mesmo sem tratamento específico, porém normalmente ocorre afastamento das pessoas nas suas atividades diárias (GUZMÁN, 2002; FIOCRUZ, 2011a). Na dengue hemorrágica, a febre é alta, com ocorrências de vômitos, manifestações hemorrágicas, hepatomegalia e insuficiência circulatória. A letalidade é significativamente maior do que na forma clássica, dependendo da capacidade de atendimento médico-hospitalar da localidade (JACOBS, 2005; OCAMPO, 2011).

Os primeiros relatos históricos sobre dengue no mundo mencionam a Ilha de Java, em 1779. Nas Américas, a doença é relatada há mais de 200 anos, com epidemias no Caribe e nos Estados Unidos. No Brasil, há referências de epidemias por dengue desde 1923, em Niterói/RJ, sem confirmação laboratorial (PAHO, 2001; BRASIL, 2009).

A Secretaria de Vigilância em Saúde faz o monitoramento dos quatro sorotipos do vírus da dengue circulantes no país. A primeira epidemia com confirmação laboratorial foi em 1982, em Boa Vista/RR com o isolamento dos

sorotipos DEN-1 e DEN-4. A partir de 1986, no Rio de Janeiro, que possui alta densidade populacional e uma vasta rede de transportes (portos, aeroportos, estradas e rodovias), o mosquito *A. aegypti* espalhou-se por todo país, com a cocirculação dos sorotipos DEN-1 e DEN-2. No ano 2000, mais de dois milhões de pessoas foram infectadas durante epidemia em 25 dos 27 estados brasileiros (BRASIL, 2001; LIMA, 2003; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

No final do ano 2000 o vírus da dengue sorotipo DEN-3 foi detectado pela primeira vez no Brasil, em Nova Iguaçu/RJ, se espalhando rapidamente e causando uma das epidemias mais graves no país no verão de 2002, com cerca de 225 mil casos notificados, sendo 1.728 de febre hemorrágica ocorrendo 61 mortes somente no Rio de Janeiro (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

A cocirculação dos sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 favoreceu o aumento no número de casos da síndrome do choque da dengue, conhecida como febre hemorrágica. A re-introdução do sorotipo DEN-4 no país é considerável, como já ocorreu em vários países vizinhos, já tendo alguns casos registrados nos estados de Roraima e Amazonas em janeiro de 2011 (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; FIOCRUZ, 2011b).

Em março de 2011, pesquisadores do Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) confirmaram por sorologia, técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) e seqüenciamento parcial do genoma viral, dois pacientes do estado do Rio de Janeiro com dengue sorotipo DEN-4. Esse sorotipo nunca havia sido registrado na região sudeste do Brasil, causando preocupação para o Ministério da Saúde, pelo aumento da chance de casos de síndrome do choque de dengue na região (FIOCRUZ, 2011a).

Nos últimos relatórios divulgado pelo Ministério da Saúde, os casos de dengue caíram 37% até 26 de fevereiro, e 64% até 31 de março de 2011, com relação ao mesmo período do ano passado, sendo cerca de 155 mil casos notificados no país, destes 2.365 casos graves e 241 óbitos suspeitos sendo destes 95 confirmados. As regiões com mais casos reportados são a Norte (31,6%), Sudeste (27%) e Nordeste (18,4%), porém 53% dos casos se concentram em cinco estados brasileiros: Amazonas, Acre, Paraná, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A análise de sorotipo viral foi realizada em 610 casos, sendo 73,1% DEN-1; 12,9% DEN-2; 1,5% DEN-3 e o sorotipo DEN-4, não notificado desde 1982, causou 12,4% dos casos (PAIXÃO, 2011a; 2011b).



### 3.2 FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença febril aguda de curta duração e de natureza viral, com gravidade variável, encontrada em países da África e das Américas Central e do Sul. Classificada como uma febre hemorrágica de origem viral, a febre amarela caracteriza-se clinicamente por manifestações de insuficiência hepática e renal, que podem levar o paciente à morte se não houver tratamento adequado. Assim como a dengue, é causada por um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivírus* da família *Flaviviridae* (BRASIL, 1999; MASSAD, 2001).

A transmissão se faz através da picada de mosquitos, como o *A. aegypti* onde o ciclo se dá homem-mosquito-homem (febre amarela urbana) e também várias espécies de *Haemagogus* e *Sabethes* onde o ciclo é macaco-mosquito-homem (febre amarela silvestre), sendo esta considerada uma zoonose. A diferença entre as formas urbana e silvestre é apenas epidemiológica, sendo semelhantes nos aspectos clínicos, histopatológicos e laboratoriais (BRASIL, 1999; MASSAD, 2001).

O primeiro relato da febre amarela é de 1648, mas na análise da sequência do genoma aparece que o vírus envolvido deriva de outros presentes em mosquitos há 3000 anos. Provavelmente foi importado da África ao novo mundo durante o tráfico de escravos, assim como os mosquitos. A febre amarela foi um dos maiores problemas nos séculos XVIII e XIX, principalmente nas Américas e África ocidental. O desenvolvimento de vacinas data de 1930, as quais tem reduzido o medo associado com a doença e o impacto médico. Entretanto, permanece como uma doença endêmica e epidêmica que afeta milhares de pessoas em áreas tropicais a África e América do Sul (MONATH, 2001).

No Brasil, a febre amarela silvestre foi descrita em 1937, já a urbana é conhecida desde 1685, ano de registro da primeira epidemia, na cidade de Recife, que na época foi responsável por muitos óbitos e perdas de natureza econômica e social (BRASIL, 1999).

A transmissão da Febre Amarela Urbana é pouco reportada no Brasil desde 1942, acredita-se ser devido a uma campanha por toda América iniciada em 1916 pela Fundação Rockefeller, seguida pela Organização Pan-americana de saúde entre os anos 1940-1960, que levou a erradicação do *A. aegypti* e também pelo desenvolvimento da vacina para este vírus. Porém a erradicação não ocorreu em

alguns países, como Suriname, Guianas, Venezuela, algumas ilhas do caribe e pelo sul dos Estados Unidos. A re-descoberta deste mosquito no Brasil ocorreu nos anos de 1976 e 1977, respectivamente nos estados da Bahia e Rio de Janeiro, pouco antes dos primeiros relatos de dengue no país (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

Embora não haja relatos de casos de febre amarela urbana no Brasil há pelo menos 60 anos, o vírus silvestre ainda causa algumas infecções. No Brasil, nos estados do Norte e Nordeste, entre os anos de 1980 e 1999 foram notificados 446 casos de febre amarela rural, com 241 mortes. O fato do *A. aegypti* contendo o vírus da febre amarela YF (*yellow fever*) comutar entre áreas silvestres e cidades com alta densidade populacional, o risco de transmissão da doença ainda é considerável no país (MASSAD, 2001; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

### 3.3 *Aedes aegypti*

O mosquito transmissor da dengue e da febre amarela, o *A. aegypti*, é originário do Egito, na África, e vem se espalhando pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta desde o século XVI, período das Grandes Navegações. No Brasil, existem registros desde o período colonial, tendo sido introduzido na época do tráfico de escravos. O mosquito foi descrito cientificamente pela primeira vez em 1762, quando foi denominado *Culex aegypti*, do latim, mosquito egípcio. O nome definitivo – *A. aegypti* – foi estabelecido em 1818, após a descrição do gênero *Aedes* (PAHO, 2001; FIOCRUZ, 2011a; URDANETA-MARQUEZ, 2011).

Relatos da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) trazem que no Brasil os primeiros casos de dengue datam do final do século XIX em Curitiba/PR, e no começo do século XX, em Niterói/RJ. Nessa época o mosquito se tornou um grande problema de saúde pública por conta da intensa transmissão de febre amarela. Foi neste contexto que Antonio Gonçalves Peryassú, pesquisador do então Instituto Soroterápico Federal, atual Instituto Oswaldo Cruz (IOC), fez descobertas, no ano 1908, sobre o ciclo de vida, os hábitos e a biologia do *A. aegypti*, que foram fundamentais para a erradicação do mosquito em território nacional nas décadas seguintes e ainda hoje norteiam as pesquisas sobre o controle do vetor. Em 1958, o Brasil era considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) livre do mosquito.

Porém, devido aos outros países da América do Sul e Central não conseguirem completa erradicação, e por um relaxamento das medidas de controle no país, houve uma re-infestação no Brasil, inicialmente nos anos 60 em Belém do Pará, e nos anos 70 no estado do Rio de Janeiro, sendo atualmente encontrado em todo país (CONSOLI, 1994; PAHO, 2001; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; FIOCRUZ, 2011a; URDANETA-MARQUEZ, 2011).

O *A. aegypti* é um mosquito doméstico de hábitos oportunistas. Ele vive dentro e ao redor dos domicílios ou em locais com bastante movimentação de pessoas, como estabelecimentos comerciais, escolas, igrejas e outros. Por esse motivo é mais comum em áreas urbanas, com alta densidade populacional, principalmente espaços de ocupação desordenada onde as fêmeas do mosquito têm a oportunidade de alimentação e dispõe de mais *criadouros* para desovar. As fêmeas possuem uma peculiaridade chamada “discordância gonotrófica” que as faz picar mais de uma pessoa por oviposição, diferentemente do pernilongo doméstico, o *Culex*. Há relatos de que um único mosquito tenha contaminado com dengue pelo menos cinco moradores de uma mesma família em um mesmo dia (JANSEN, 2010; FIOCRUZ, 2011a).

Diferentemente do pernilongo doméstico (*Culex quinquefasciatus*) que possui hábitos noturnos, o *A. aegypti* apresenta hábitos diurnos e se alimenta principalmente de sangue humano, tendo sua população aumentada no período do verão, devido à elevação da temperatura e intensificação das chuvas, fatores que propiciam a eclosão dos ovos. Dentro das casas é fácil diferenciá-los: quando adulto, o *Culex* tem uma coloração marrom e as pernas não possuem marcação clara, enquanto o *A. aegypti* é mais escuro e possui marcações brancas no corpo e nas pernas, como pode ser visualizado na FIGURA 4 (FIOCRUZ, 2011a).



(A) (B)  
FIGURA 4 - DIFERENCIAÇÃO ENTRE O PERNILONGO DOMÉSTICO *Culex quinquefasciatus* (A) E  
O MOSQUITO *Aedes aegypti* (B)  
FONTE: (FIOCRUZ, 2011a)

O *A. aegypti* é mais ativo durante o dia, em especial no início da manhã e no fim da tarde, alimentando-se de sangue, geralmente nas partes baixas do corpo, como pés e canelas. Por ser um mosquito oportunista, pode picar mesmo no período noturno, caso ao dormir a pessoa deixe pernas ou braços expostos. É um mosquito discreto, raramente notado quando se alimenta de sangue, e muito arisco, fugindo com qualquer movimento mais brusco. Já o pernilongo doméstico é um mosquito estritamente noturno, que prefere se alimentar no horário em que as pessoas estão em repouso. Ele é atraído pelo gás carbônico emitido na respiração humana, voando próximo do rosto, e só depois escolhe um local para picar. É por isso que costumamos ouvir zumbidos tão característicos de sua aproximação (FIOCRUZ, 2011a).

O desenvolvimento das fases do ciclo morfogênético do mosquito *A. aegypti* se dá em *criadouros*. Primeiramente ocorre a oviposição e a subsequente morfogênese, ou seja, várias fases larvais (ínstars), pupa até a formação dos adultos volantes. Portanto, tanto os ovos como as larvas e pupas ocupam o mesmo ambiente, a água doce. Os *criadouros* variam desde aqueles a céu aberto quanto àqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico. São representados principalmente por pneus, latas, vidros, cascos de garrafas, tonéis, latões e cisternas destapadas ou mal tapadas, lagos artificiais e plantas como bromélias (FIOCRUZ, 2011a).

A postura das fêmeas varia de 50 a 500 ovos, normalmente depositados em locais passíveis de serem inundados. Do ovo à forma adulta, o ciclo de vida do *A.*

*aegypti* varia de acordo com a temperatura e a disponibilidade de alimentos, competição entre as larvas, etc., podendo os ovos permanecer viáveis por vários meses fora da água. Em lugares com temperaturas ambiente abaixo de 20 °C ocorre drástica redução no desenvolvimento e na reprodução do mosquito. A fase larvária compreende quatro estágios aquáticos, como pode ser visto na FIGURA 5, de vida livre e grande mobilidade (HOTCHKIN, 1985; FIOCRUZ, 2011a).

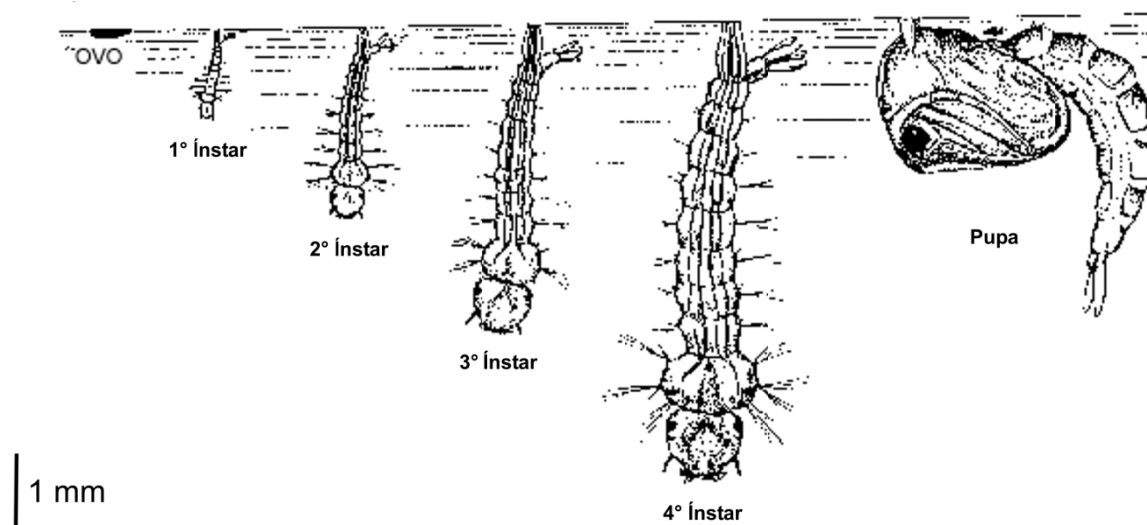


FIGURA 5 - DESENVOLVIMENTO DE OVO A PUPA DO *Aedes aegypti*

NOTA: Tamanho médio aproximado das larvas nos diferentes estágios: (1º instar) - 1,5 mm; (2º instar) - 2,5 mm; (3º instar) - 4,2 mm e (4º instar) - 6,2 mm.

FONTE: Adp.(CECOM)

As larvas adquirem os alimentos mediante filtragem e a duração de todo o período é de 8 a 10 dias. A seguir, as larvas, representadas na FIGURA 6 (A) se desenvolvem para pupas, também em ambiente aquático, que dura cerca de dois dias, para então ocorrer à ecdise pupal e a liberação do adulto representado na FIGURA 6 (B). Os mosquitos adultos machos procuram substâncias açucaradas como néctar e seiva de flores, o orvalho, as frutas. As fêmeas têm o hábito de sugar sangue, fenômeno que se designa hematofagia, já que este alimento é necessário para a maturação dos ovos (HOTCHKIN, 1985; FIOCRUZ, 2011a).

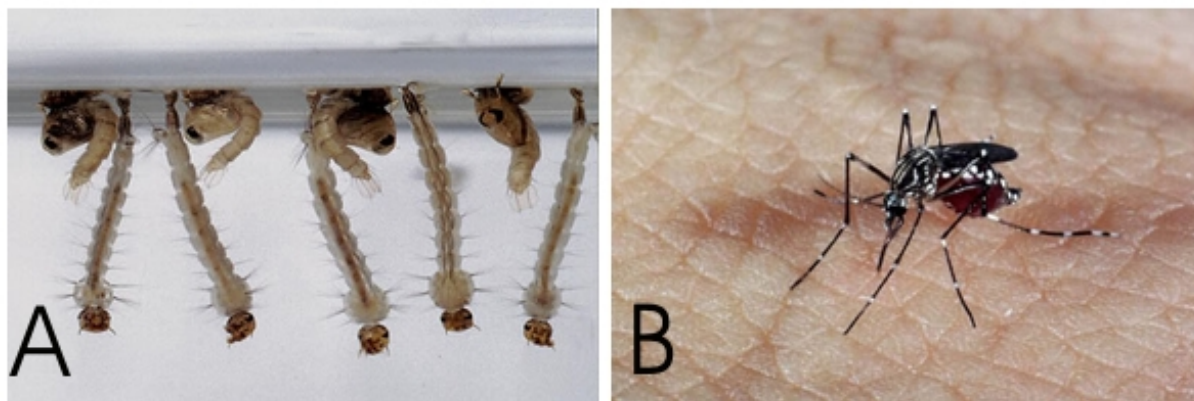


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DO *Aedes aegypti*

FONTE: (IVDRJ, 2008)

NOTA: (A) larvas e o seu desenvolvimento para pupas; (B) forma adulta (mosquito)

O acasalamento do *A. aegypti* se dá dentro ou ao redor das habitações, geralmente nos primeiros dois dias após o mosquito chegar à fase adulta. A reprodução é concretizada após apenas uma cópula, pois as fêmeas guardam o esperma na espermateca. Após a cópula, as fêmeas precisam realizar a hematofagia para o desenvolvimento completo dos ovos e sua maturação nos ovários. Normalmente, após três dias as fêmeas se tornam aptas para a postura dos ovos. Inicialmente, estes possuem cor branca, mas devido ao contato com o oxigênio escurecem, como pode ser observado na FIGURA 7. Os ovos do *A. aegypti* adquirem resistência ao ressecamento muito rapidamente, em apenas quinze horas após a postura. A partir de então, podem resistir a longos períodos de dessecação. Alguns estudos sugerem que eles sejam viáveis por até 450 dias sem água. Já o pernilongo doméstico, *Culex*, coloca seus ovos diretamente na água, e estes ovos perdem a viabilidade em caso de ressecamento (FIOCRUZ, 2011a).



FIGURA 7 - OVOS DO *Aedes aegypti*  
FONTE: (FIOCRUZ, 2011a)

O controle deste vetor é muito importante, como a eliminação dos lugares de crescimento dos mosquitos no ambiente doméstico, mas é difícil a eliminação do vetor de uma grande área por um período prolongado, portanto estratégias de controle biológico devem contribuir para o controle do vetor no futuro (JACOBS, 2005).

### 3.4 MÉTODOS DE CONTROLE DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS

Os mosquitos são artrópodos de grande importância para a saúde pública, já que são importantes vetores de doenças e pragas, além das picadas serem responsáveis por reações alérgicas tanto locais, com edema e eritema, quanto sistêmicas, como urticária e angioedema.

Os repelentes podem ser usados preventivamente, pois tem o objetivo de minimizar o contato destes mosquitos com os seres humanos. Na grande maioria são compostos por DEET (N, N-dietil-meta-metilbenzamida ou N, N-dietil-3-metilbenzamida) (FIGURA 8), porém este apresenta como desvantagem o fato de além de reações tóxico-alérgicas ainda causa danos materiais como em tecidos sintéticos e superfícies pintadas (GILLIJ, 2008).

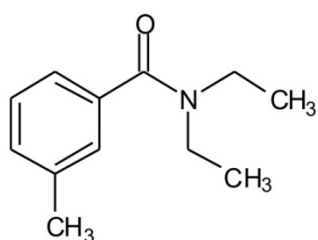


FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DA N, N-DIETIL-3-METILBENZAMIDA (DEET)  
FONTE: O autor (2011)

As formas mais utilizadas de controle de disseminação das doenças relacionadas ao *A. aegypti* estão relacionados ao controle dos *criadouros* do mosquito, impedindo que os ovos cheguem à fase adulta. O incentivo por parte do governo é reduzir o número de focos onde as fêmeas adultas depositem seus ovos, locais com água parada, reduzindo assim a população de mosquitos adultos (BRASIL, 2001).

No Brasil, as estratégias para controle do principal vetor da dengue e febre amarela são baseadas na utilização de inseticidas químicos, como organofosforados (Temefós) e piretróides (Cipermetrina) - FIGURA 9 - para reduzir a densidade de adultos durante epidemias e tratamento de *criadouros* com Temefós. Porém, a resistência desenvolvida por algumas cepas do mosquito está favorecendo o aumento gradativo na quantidade de adultos e consequentemente ao aumento no número de casos de dengue no país (LIMA, 2003; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; LUNA, 2004; MACORIS, 2007; MELO-SANTOS, 2010). Sendo assim, o uso de inseticidas químicos não é mais considerado uma boa forma de eliminar os mosquitos, já que estes estão cada vez mais resistentes a essas substâncias e assim gerando descendentes também resistentes, e consequentemente uma população predominantemente imune. Fora isso, o uso de inseticidas causa sérios danos à natureza (BRASIL, 2001). Além disso, a falta de serviços urbanos, a proliferação de favelas e assentamentos subdesenvolvidos dentro e em torno das cidades tem dificultado o controle da dengue e o *A. aegypti* tornou-se endêmico em várias partes do país.



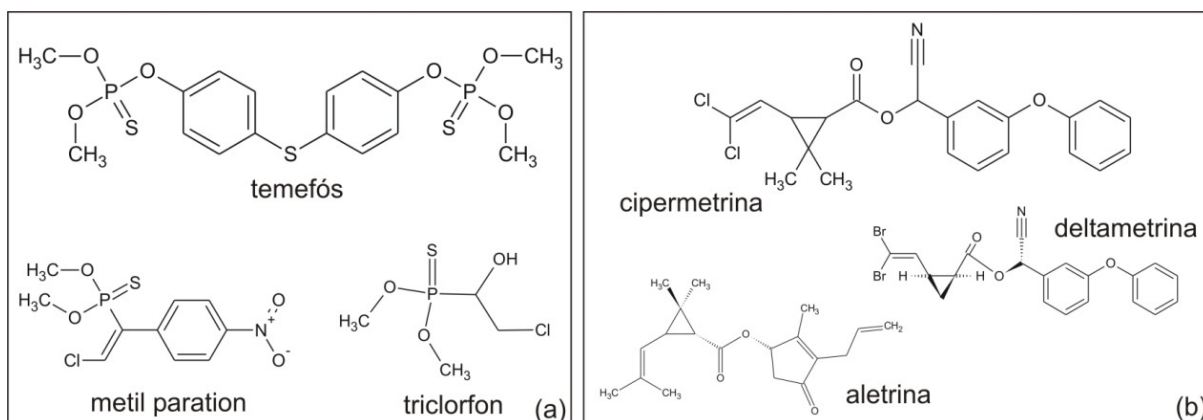


FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS INSETICIDAS QUÍMICOS ORGANOFOSFORADOS (a) E PIRETRÓIDES (b)  
 FONTE: O autor (2011)

Em estudo realizado no estado do Paraná, os mosquitos foram submetidos a dois inseticidas químicos, Temefós e Cipermetrina. Os resultados mostraram que o controle com temefós ainda é viável, porém os mosquitos já apresentaram resistência a Cipermetrina. O estudo sugere ainda a imediata substituição destes inseticidas por outros produtos de origem química ou biológica (LUNA, 2004).

Os óleos essenciais e extratos de plantas são potenciais fontes de compostos com atividade tóxica para o controle dos mosquitos vetores da dengue e febre amarela, além de muitos ainda serem potencialmente repelentes. Esta atividade está associada às plantas que possuam os monoterpenos como o  $\alpha$ -pineno, limoneno, terpinoleno, citronelol, citronelal, cânfora e timol e os sesquiterpenos, como o  $\beta$ -cariofileno que é extremamente citado como um dos mais fortes repelentes contra o *A. aegypti* (GILLIJ, 2008).

### 3.5 ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE DO *Aedes aegypti*

Métodos alternativos para o controle do *A. aegypti* são necessários para controlar o avanço deste vetor da dengue e febre amarela. O controle baseado somente em inseticidas sintéticos está se tornando cada dia mais ineficiente devido às características adaptativas do mosquito, então a cada dia doses maiores estão sendo utilizadas, causando danos ao homem e ao ecossistema. A imensa flora brasileira devido a sua biodiversidade pode ser explorada para o desenvolvimento

de larvicidas eficazes, sem causar efeitos maléficos ao ambiente (LUNA, 2005). Algumas espécies botânicas nativas ou exóticas do Brasil foram escolhidas com base em dados já descritos na literatura e/ ou experiência prévia no Laboratório, devido à presença de metabólitos secundários importantes e com alto potencial larvicida para o vetor e estão descritas a seguir.

### 3.5.1 *Annona muricata*

Dentre as mais diversas plantas utilizadas pela população, tanto com intuito curativo como praguicida, a família Annonaceae vem se destacando com diferentes atividades biológicas (ex. antiparasitária, pesticida e antitumoral). *Annona muricata* ou graviola pertence ao gênero *Annona*, o qual possui cerca de 100 espécies de árvores e arbustos. A espécie é nativa de países tropicais da América, representada na FIGURA 10, sendo uma das quatro principais espécies da família que produz frutos comestíveis. Nas mais diversas partes do mundo é conhecida como graviola, *soursop*, *sir sak*, *suirsak*, *corrosol*, *sapote agrio*, coração de rainha, *chachimán-épeineux* ou *guanabana*. Seus frutos são utilizados comercialmente para a produção de sucos, balas e sorvetes (BUESO, 1980).

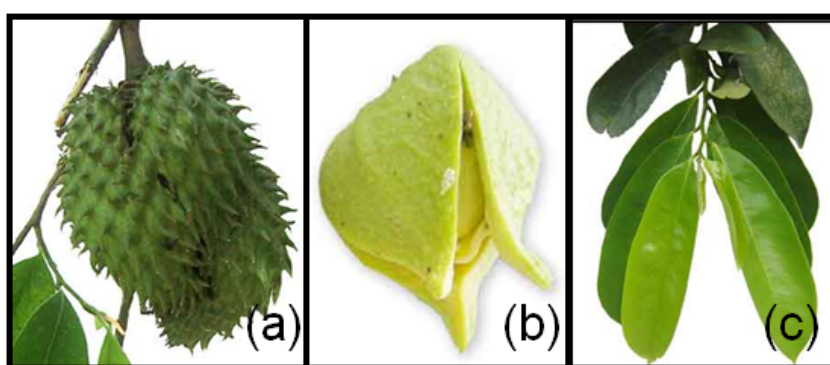


FIGURA 10 - FRUTOS, FLORES E FOLHAS DE *Annona muricata*  
NOTA: (a) Frutos, (b) Flores e (c) Folhas de *Annona muricata*.

Dentre os compostos presentes na graviola, destacam-se os ácidos graxos, terpenóides e acetogeninas. No óleo essencial das folhas, obtido através de destilação por vapor e analisado por Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa acoplado a Massa (CG/MS), estão presentes 80 compostos, sendo os

constituintes mais abundantes  $\beta$ -cariofileno (13,6%),  $\Delta$ -cadineno (9,1%), epi- $\alpha$ -cadinol (8,4%) e  $\alpha$ -cadinol (8,3%) (KOSSOUOH, 2007).

Setenta espécies a partir de cinco gêneros (*Annona*, *Goniothanlamus*, *Rollinia*, *Uvaria* e *Xylopia*) da família Annonaceae são fontes de acetogeninas (GU, 1995). Na *A. muricata* (graviola), estas acetogeninas estão concentradas principalmente nas sementes que são um subproduto industrial (GLEYE, 1997). Como exemplo, somente a empresa baiana BRASFRUT (visitada em Julho de 2011) processa, por ano-colheita, cerca de 500 toneladas de polpa de graviola, o que corresponde, em média, a cerca de 8% de sementes, ou seja, 40 toneladas de sementes.

As acetogeninas são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa (32 ou 34 carbonos), combinados com o 2-propanol, que é incorporado na forma de uma  $\gamma$ -lactona insaturada, conforme estrutura base apresentada na FIGURA 11. Frequentemente ocorre à inserção de um a três anéis tetrahydrofurano (THF) no centro da cadeia carbônica, havendo ainda duplas ligações e um variado grau de átomos de oxigênio, sob a forma de hidroxilas e menos frequentemente carboxilas, cetonas, epóxidos. A provável rota de biossíntese das acetogeninas é a via dos policetídeos. Os anéis THF são formados de dienos, trienos ou grupos cetônicos através de epoxidação e ciclização. A classificação é baseada de acordo com o número e arranjo dos anéis THF, em mono-THF, di-THF adjacente, bis-THF não adjacente e tri-THF (GU, 1995).

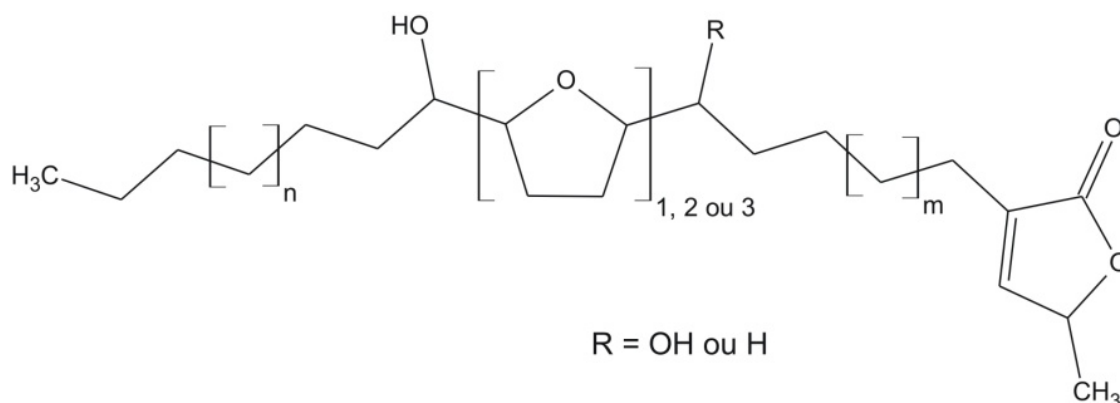


FIGURA 11 - ESTRUTURA GERAL DAS ACETOGENINAS  
FONTE: O autor (2011)

As acetogeninas são facilmente solúveis em metanol, etanol, acetona, diclorometano, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO) e outros solventes orgânicos,

mas não se dissolvem facilmente em hexano ou água. A extração com diferentes partes das plantas é feita normalmente com percolação fria utilizando metanol ou etanol. Algumas vezes, é utilizada percolação ou Soxhlet com hexano a partir das sementes com o escopo de desengorduramento, ou seja, descarte dos TAGs – triacilgliceróis, família lipídica dominante. Normalmente, depois desta extração são realizadas sucessivas extrações líquido-líquido para o isolamento das acetogeninas, agora com solventes mais polares. Visualmente as acetogeninas são detectadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), usando ácido fosfomolibdico em 95% de etanol, revelado com aquecimento. Alternativamente e com aguda especificidade é utilizado o reativo de Kedde para identificar as acetogeninas  $\alpha$  e  $\beta$  insaturadas e  $\gamma$ -lactonas, que também exibem absorção no UV em 210nm (GU, 1995). A coloração do revelado varia do rosa suave ao rosa-avinhado, dependente de concentração, mas apresenta o inconveniente de rápida descoloração (“*fading*”).

As atividades biológicas de *A. muricata* estão principalmente relacionadas às acetogeninas, como as propriedades citotóxica, antitumoral, sedativa, adstringentes, antireumática, emética, imunossupressora, antiparasitária, antimicrobiana e pesticida – FIGURA 12 (DOS SANTOS, 2001). Como exemplo, as acetogeninas mais polares de sementes de graviola foram empregadas, com sucesso, na inibição alimentar (“*feed deterrance*”) de duas pragas agrícolas importantes, respectivamente predadoras da soja e trigo, as lagartas *Anticarsia gemmatilis* e *Pseudoaletia sequax*, em doses tão reduzidas tanto quanto apenas 18  $\mu$ g/folha (FONTANA, 1998).

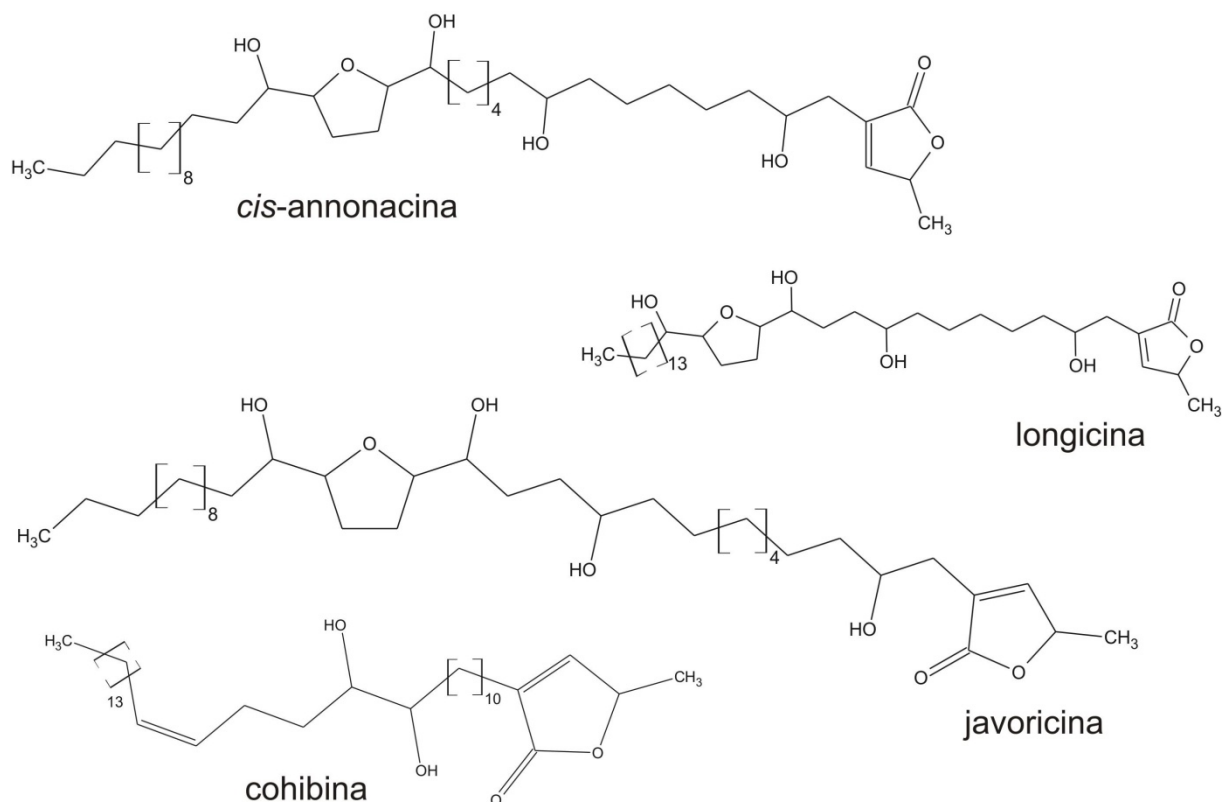


FIGURA 12 – PRINCIPAIS ACETOGENINAS ENCONTRADAS NAS SEMENTES DE *Annona muricata*  
 FONTE: O autor (2011)

O modo de ação primário ocorre a nível mitocondrial, pois as acetogeninas são potentes inibidores da atividade respiratória no complexo I na membrana interna. Ocorre a inibição da enzima NADH: ubiquinona oxirredutase, dificultando principalmente a fosforilação oxidativa da mitocôndria, ou seja, ocorre uma modificação no sistema de transporte de elétrons, inibindo a conversão de ADP e fosfato inorgânico em ATP (GU, 1995; FONTANA, 1998). Um segundo modo de ação das acetogeninas está relacionado com a atividade seletiva em tumores, onde ocorre uma inibição da atividade da enzima NADH oxidase na membrana celular. Esta seletividade está baseada nas diferenças da atividade da NADH oxidase nas vesículas plasmáticas da membrana derivados de células de fígado de rato normal e daquelas derivadas de células cancerosas (Hela - Carcinoma cervical humano ou HL-60 – Leucemia promielocítica humana) (GU, 1995).

A suscetibilidade de larvas de *A. aegypti* e *Anopheles albimanus* foi avaliada frente a extratos das sementes de *A. muricata*. Foi obtido um extrato não-polar com éter de petróleo e com o resíduo foi realizada a extração com etanol, denominado polar. Ambos os extratos mostraram atividade, com CL<sub>50</sub> para larvas de *A. aegypti*

de 74,7 (polar) e 236,2  $\mu\text{g/mL}$  (não-polar) e em larvas de *Anopheles* de 0,8 (polar) e 16,2  $\mu\text{g/mL}$  (não-polar) (MORALES, 2004). Ainda contra larvas de IV estágio de *A. aegypti*, avaliou-se a toxicidade dos extratos etanólicos das sementes, flores, folhas, cascas de caule e raízes de *A. muricata*. A mortalidade foi de 100% no extrato das sementes em 24 horas de ensaio, seguido do extrato das flores em 48 horas e das folhas em 36 horas, nas concentrações de 0,5, 10 e 100 mg/mL, respectivamente. As  $\text{CL}_{50}$  em 48 horas de exposição foram de 0,02 mg/mL para as sementes, 3,33 mg/mL para flores, 8,25 mg/mL em folhas e 19,21 mg/mL em cascas de caule (BOBADILLA, 2005).

### 3.5.2 *Ilex paraguariensis*

*Ilex paraguariensis* A. St-Hil. (Aquifoliaceae), popularmente conhecida como erva-mate (FIGURA 13), é uma árvore nativa da América do Sul, encontrada principalmente na Argentina, Paraguai, Uruguai e sul do Brasil (GIULIAN, 2007; HECK, 2007; STRASSMANN, 2008). O chá-mate, tererê e o chimarrão, bebidas obtidas da erva-mate são largamente consumidas nos países da América do Sul e tem sido difundidas pelo mundo (BRAVO, 2007; HECK, 2007).



FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DA *Ilex paraguariensis*

NOTA: (a) Árvore do *Ilex paraguariensis* e o detalhe de suas (b) folhas. (c) Bebida à base de erva-mate – chimarrão.

Estas bebidas são consumidas devido aos efeitos diuréticos, antiinflamatórios, antioxidantes e propriedades estimulantes (BASTOS, 2006b; BRAVO, 2007; JACQUES, 2008). Estima-se que o consumo anual de mate no sul do Brasil é de aproximadamente 1,2 kg por pessoa (JACQUES, 2008). No Brasil, a produção

acumulada de erva-mate foi superior a quatro milhões de toneladas no período de 1996 a 2005 (BRASIL, 2008).

Dentre os inúmeros componentes ou metabólitos secundários presentes nesta espécie, ressalta-se a presença de metilxantinas, uma classe de alcalóides púricos (CARDOZO JR, 2007; ASHIHARA, 2008; JACQUES, 2008). Estes alcalóides também são encontrados em outras espécies como o café (*Coffea arabica*), chá-verde (*Camellia sinensis*) e cacau (*Theobroma cacao*) (DUFRESNE, 2000; ZHENG, 2004; CAMPA, 2005; DENG, 2008).

A principal metilxantina encontrada na erva-mate é a cafeína (0,89 – 1,73 g%) seguida pela teobromina (0,26 – 0,88 g%), com menores quantidades de teofilina (FIGURA 14) (CARDOZO JR, 2007; HECK, 2007). As metilxantinas possuem diversas propriedades farmacológicas, incluindo a estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, relaxamento da musculatura lisa e estimulação do miocárdio (CARDOZO JR, 2007; MYERS, 2007).



FIGURA 14 - ESTRUTURA DAS METILXANTINAS CAFEÍNA, TEOFILINA E TEOBROMINA  
FONTE: O autor (2011)

A quantidade de xantinas presente nas folhas de erva-mate está associada com a variabilidade genética, ambiente do cultivo, tempo para a colheita e tipos de processamento da planta (branqueamento, secagem, envelhecimento) (BASTOS, 2006a; CARDOZO JR, 2007; HECK, 2007). Algumas plantas podem aumentar a síntese de metilxantinas em condições de estresse, como alta luminosidade (período do verão), ou ainda como mecanismo de defesa contra insetos e fungos desfolhantes (SCHUBERT, 2006; COELHO, 2007; STREIT, 2007; ASHIHARA, 2008). A cafeína já foi avaliada com contra larvas de *A. aegypti* e apresentou eficácia até 25 dias após a aplicação (GUIRADO, 2010).



### 3.5.3 *Melia azedarach*

A *Melia azedarach* L. (FIGURA 15) é uma árvore ornamental, originária da China, Índia e/ou Paquistão. É também conhecida como “cinamomo”, “Santa Bárbara” e “*Chinaberry tree*”, sendo amplamente empregada pelas populações indianas (SRIVASTAVA, 1986).

A família Meliaceae se apresenta como árvores ou arbustos, raramente como semi-arbustos ou ervas, com células secretoras de resina contendo óleos nas folhas, córtex e frutos. Normalmente produz triterpenóides amargos (limonóides), às vezes produzem cumarinas, taninos e também protoantocianinas e raramente substâncias saponíferas. A madeira é muito forte e aromática, algumas vezes silicificada (CRONQUIST, 1988; KUMAR, 1996).

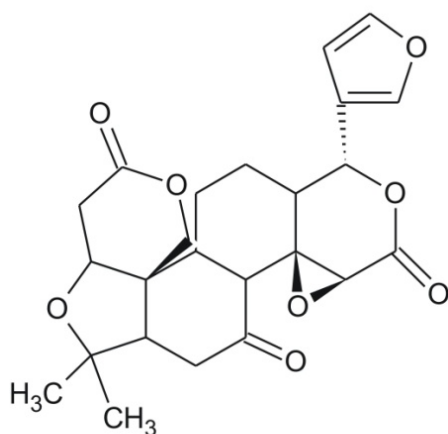


FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DE *Melia azedarach*

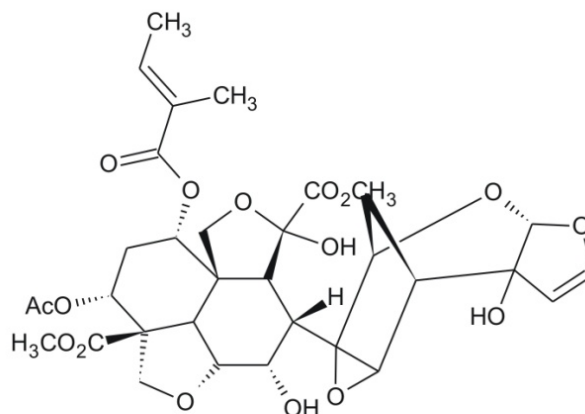
NOTA: (a) Árvore de *Melia azedarach* com detalhe de suas (b) flores e (c) frutos.

Os limonóides ou triterpenóides (FIGURA 16) já foram isolados de outras famílias de plantas como a Rutaceae e Cneoraceae. Sendo que a provável rota biossintética prevê como precursor um triterpeno, que dá origem aos triterpenóides pela perda de quatro átomos de carbono. Esta rota envolve vários passos, que leva a formação de inúmeras estruturas, que normalmente contém 26 átomos de carbono no seu esqueleto básico (CONNOLLY, 1983).





limonóide



azadiractina A

FIGURA 16 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE UM LIMONÓIDE E DA AZADIRACTINA A  
FONTE: O autor (2011)

Foi relatada a ocorrência de um limonóide glicosídico, a exemplo do que ocorre com a salanina e meldenina; o açúcar envolvido é a ramnose (SRIVASTAVA, 1986). Muitos limonóides têm sido isolados da família Meliaceae e apresentam interesse considerável, particularmente pelas suas propriedades inseticidas.

A partir das sementes de frutos maduros de *M. azedarach* e *Azadirachta indica* a equipe do LQBB-UFPR – Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa obteve extratos com diferentes solventes (etanol, metanol e mistura de clorofórmio: metanol na proporção 1:1) que foram testados em larvas de terceiro ínstar de *A. aegypti*, com temperaturas de 25 e 30 °C e ainda com e sem alimentação. Os melhores resultados foram com o extrato metanólico de *M. azedarach* à temperatura de 25 °C e 30 °C com e sem alimento, com a CL<sub>50</sub> (Concentração Letal para 50% da população) de 4,4 mg/100mL (WANDSCHEER, 2004).

Em testes utilizando a espécie proveniente da Argentina, comparando os frutos e folhas senescentes de *M. azedarach* em larvas de primeiro ínstar de *A. aegypti*, Coria (2008) constatou que o extrato de folhas possui maior atividade larvicida, resultando em todas as larvas mortas antes da pupação, e retardando significativamente o tempo de desenvolvimento larval. A oviposição das fêmeas do mosquito também é fortemente inibida pela presença do extrato. Já com o extrato da fruta, todos os efeitos foram mais fracos (CORIA, 2008).

### 3.5.4 *Nicotiana tabacum*

A espécie *Nicotiana tabacum* (FIGURA 17) é um dos mais antigos inseticidas utilizados no mundo. A nicotina obtida de espécies de *Nicotiana* foi empregada como inseticida, pela primeira vez, no fim do século XVII na França, sob a forma de lavagem de fumo. Esse alcalóide foi isolado em 1828 e seu emprego em larga escala data do início do século. Junto com a nicotina (alcalóide majoritário) do tabaco, representando cerca de 97% da fração alcaloídica total), outros alcalóides também foram isolados: nornicotina, nicotimida, anabasina, isonicotéina, anatabina, nicotirina, nicotéina e outros menos importantes. A atividade é restrita à nicotina, nornicotina e anabasina (SIMÕES, 2004; STUMPF, 2007).



FIGURA 17 - FOLHAS DE *Nicotiana tabacum*

NOTA: (a) Plantação de *Nicotiana tabacum*, com detalhe de suas (b) folhas *in natura* e (b) amarradas formando as “bonecas”.

A nicotina (FIGURA 18) é agonista nos receptores da acetilcolina, e os receptores nicotínicos tem um papel fundamental na transmissão sináptica de todo o sistema nervoso dos insetos (STUMPF, 2007).

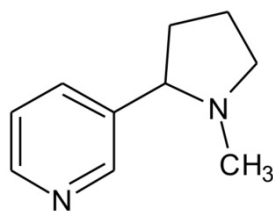


FIGURA 18 - ESTRUTURA QUÍMICA DA NICOTINA

FONTE: O autor (2011)

### 3.5.5 *Origanum vulgare*

Também conhecido como orégano, o *Origanum vulgare* (FIGURA 19), é nativo da Europa e pertence à família Lamiaceae. As suas folhas secas são bastante utilizadas na culinária, mas é também utilizada na elaboração de cosméticos, fármacos e licores.

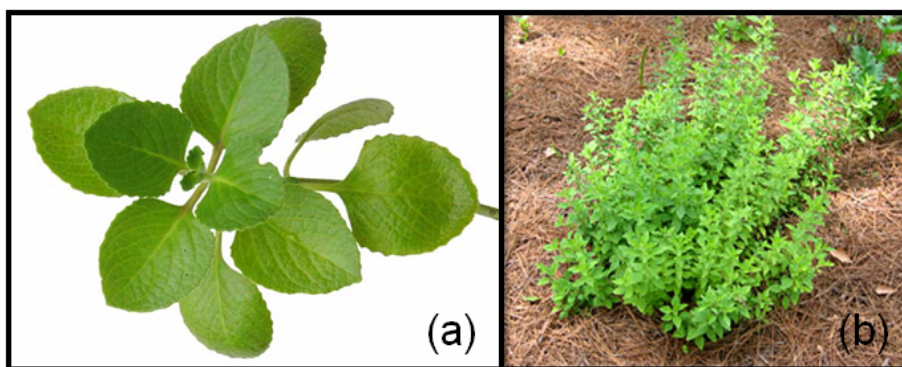


FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO DO *Origanum vulgare*  
NOTA: (a) Folhas e (b) Arbusto

A espécie é rica em *p*-cimeno e seus derivados fenólicos carvacrol e timol (FIGURA 20). Estas substâncias são monoterprenóides representam um pequeno grupo de compostos aromáticos, responsáveis por fragrâncias intensas, e são produzidos pela via da rota do mevalonato seguido por compostos aromáticos que envolvem o ácido chiquímico.

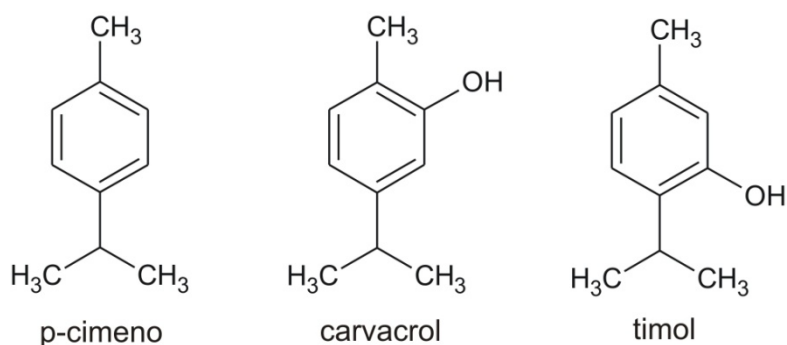


FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DO *p*-CIMENO E SEUS DERIVADOS FENÓLICOS CARVACROL E TIMOL  
FONTE: O autor (2011)

A composição química do orégano já foi determinada em estudos utilizando extratos aquosos e seus óleos essenciais. Foram identificados flavonóides como

apigenina e luteolina, e também agliconas, alcoóis alifáticos, compostos terpênicos e derivados dos fenilpropano. Foram encontrados os ácidos cumárico, ferúlico, caféico, r-hidroxibenzóico e vanillínico.

Um éster derivado do ácido láctico, o ácido 2-O-cafeiol-3-(3,4-di-hidróxi-fenil)-D-lático, também denominado de ácido rosmarínico está presente na espécie (SIMÕES, 2004).

As principais atividades biológicas do orégano são antioxidante, antimicrobiana, estrogênica, antigenotóxica e inseticida.

O efeito antioxidante se deve à presença de grupos hidroxila nos compostos fenólicos e sua atividade tem sido determinada pela sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica, protegendo o DNA do dano por radicais livres. Esta atividade já foi determinada por diferentes metodologias e os extratos de orégano se mostraram muito eficientes (ARCILA-LOZANO, 2004).

Existem estudos sobre a atividade antimicrobiana contra bactérias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* e *Enterobacter cloacae*. Também contra as bactérias gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*. Ainda tem a capacidade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* e *Rhodotorula*. Foi avaliada a atividade dos componentes isolados, onde o carvacrol e timol apresentaram níveis altos de atividade contra microrganismos gram negativos (ARCILA-LOZANO, 2004).

O alto nível de carvacrol e timol apresentaram CL<sub>50</sub> em larvas de *Culex pipiens* de 37,6 e 36 µg/mL, respectivamente. Outros compostos ativos como a mentona, o 1,8-cineol, o linalol (ARCILA-LOZANO, 2004).

### 3.5.6 *Piper nigrum*

A espécie *Piper nigrum*, que faz parte da família Piperaceae, composta por mais de duas mil espécies, é também conhecida popularmente como pimenta do reino ou pimenta-preta (FIGURA 21). É comumente encontrada em regiões de clima tropical, principalmente na Índia, de onde é originária, e é amplamente utilizada

como condimento de cozinhas regionais e também na medicina popular (CHAITHONG, 2006).



FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO DE *Piper nigrum*

NOTA: (A) Árvores, (b) folhas e frutos verdes e (c) frutos maduros

Diversas espécies da família das pimentas já foram descritas como potenciais inseticidas para o controle de pestes, como a *P. longum*, *P. guianacastensis* e a *P. nigrum*. Os extratos de *P. nigrum* já foram avaliados em diferentes vetores de doenças, como *Trypanossoma cruzi* (doença de Chagas), *Anopheles stephensi*, (malária) e também contra diferentes mosquitos, *Culex pipiens pallens*, *A. aegypti* (dengue e febre amarela) e *A. togoi* (RIBEIRO, 2004; CHAITHONG, 2006; VINAYAGAM, 2008). Os constituintes ativos foram identificados como isobutilamidas (pellitorina, guineensina, piperida e retrofractamida A), que apresentaram  $CL_{50}$  na ordem de  $\mu\text{g/mL}$  (PARK, 2002).

Dentre os inúmeros metabólitos secundários presente nesta espécie, destaca-se o alcalóide piperina (FIGURA 22), encontrado, sobretudo nos frutos, sendo extremamente abundante, cerca de 3-7% de rendimento em frutos secos (RIBEIRO, 2004).

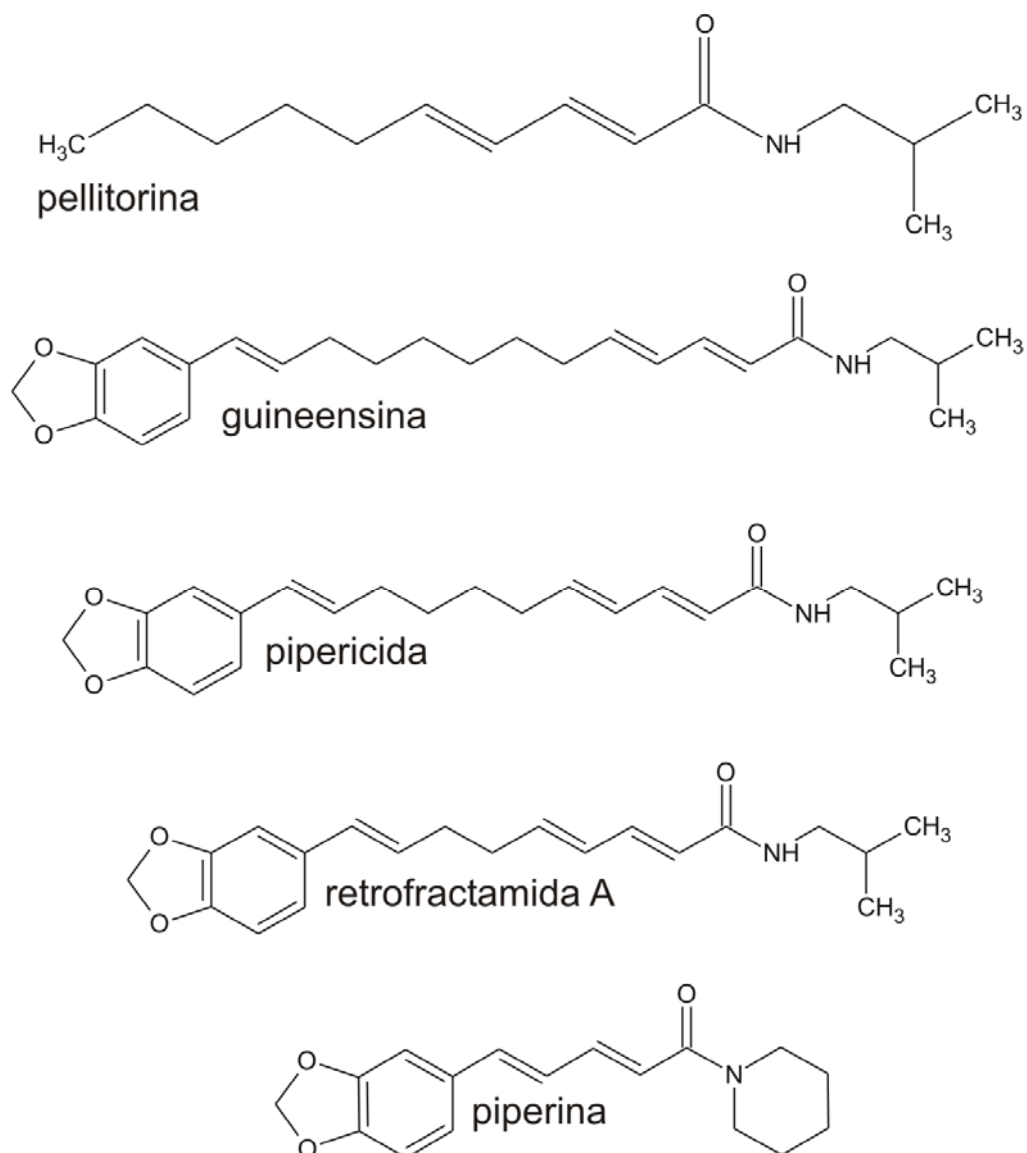


FIGURA 22 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PIPERINA E ISOBUTILAMIDAS RELACIONADAS  
 FONTE: O autor (2011)

Contra as larvas de *Aedes aegypti* resistentes a piretróides foi experimentado o extrato etanólico de *P. nigrum*. O fracionamento deste resultou no isolamento das amidas piperoleína-A e piperina. As CL<sub>50</sub> são de ordem de ppm, sendo 0,98 para o extrato etanólico, 1,46 para a piperoleína-A e 1,53 para a piperina, demonstrando assim que estas amidas não atuam isoladamente (SIMAS, 2007).

Em estudo realizado foi possível observar que o modo de ação e toxicidade é muito similar entre as diferentes espécies de pimenta. Sintomaticamente, as larvas do *A. aegypti* de 4º ínstar, quando expostas a uma CL<sub>99</sub> de extrato etanólico de pimenta, após 5 minutos apresentam comportamento visivelmente anormal, com excitação, inquietação e lentidão. Por 10-30 minutos de contato, as larvas realizando



movimentos de espiral seguidos de submersão. De 30-60 minutos, observam-se sintomas de intoxicação como tremores e convulsões. Após duas horas de contato mais de 50% das larvas já estavam mortas, e as outras moribundas ou paralisadas. Analisando a morfologia das larvas tratadas com extrato de *Piper spp.* foi possível perceber alteração anatômica somente nas guelras (papilas anais), órgão envolvido na regulação de níveis de eletrólitos (CHAITHONG, 2006).

### 3.5.7 *Plumbago capensis*

A espécie *Plumbago capensis* (sin. *Plumbago auriculata*) (FIGURA 23), também conhecido por bela-emília, pertence à família Plumbaginaceae, que possui aproximadamente 20 gêneros e 500 espécies. É arbustiva, originária da África que requer cultivo em locais com elevada exposição à luz e adubação (DE PAIVA, 2002).

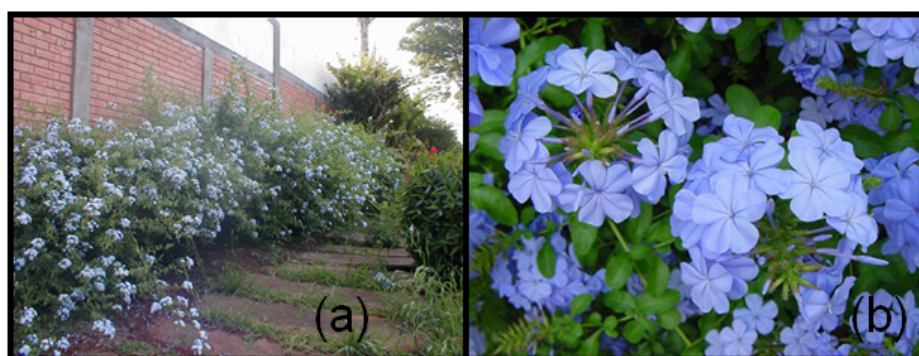


FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO DO *Plumbago capensis*  
NOTA: (a) Arbusto de *Plumbago capensis* e o detalhe das (b) flores.

As plantas do gênero *Plumbago* têm sido usadas na medicina popular como anti-reumático, purgativo, contra sífilis e dores de dente. Algumas das atividades biológicas atribuídas às espécies de *Plumbago* estão relacionadas com a presença da naftoquinona plumbagina (FIGURA 24), isolada principalmente das raízes (DE PAIVA, 2002).

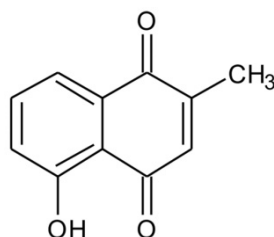


FIGURA 24 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PLUMBAGINA  
FONTE: O autor (2011)

A atividade da plumbagina já foi avaliada contra *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de chagas, e foi 100% ativa na concentração 250 µg/mL de sangue contaminado (SAÚDE-GUIMARÃES, 2007).

### 3.5.8 *Tabebuia avellanedae*

A espécie *Tabebuia avellanedae* (FIGURA 25) é popularmente conhecida como Ipê-roxo, lapacho, Ipê-roxo-da-mata, Ipê - uma, Taheebo ou Pau D'arco.



FIGURA 25 - REPRESENTAÇÃO DA *Tabebuia avellanedae*  
NOTA: (a) Árvore da *Tabebuia avellanedae* e o detalhe de suas (b) flores.

As plantas do gênero *Tabebuia* apresentam um amplo espectro de atividade tal como antifúngica, ação antibacteriana contra *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus*, e também apresenta atividades como anti-inflamatória, antioxidante e antiulcerogênica (PARK, 2006; TWARDOWSCHY, 2008).

Na medicina popular, a espécie é utilizada como anti-inflamatória, tratamento de úlceras, diurético, adstringente e contra infecções bacterianas ou fúngicas. É bastante utilizada externamente na forma de cataplasma ou um chá concentrado



para tratar uma variedade de doenças inflamatórias da pele, incluindo eczemas, psoríase, infecções fúngicas e câncer de pele (YAMASHITA, 2007; BYEON, 2008; TWARDOWSCHY, 2008).

Comercialmente o extrato das cascas de ipê-roxo é vendido para o tratamento de diversas doenças como gastrites, porém ainda necessita de estudos para a validação do seu uso (TWARDOWSCHY, 2008).

Compostos isolados de espécies do gênero *Tabebuia* (benzenóides, menadiona, lapachona e lapachol – FIGURA 26) revelam também várias atividades biológicas (TWARDOWSCHY, 2008).

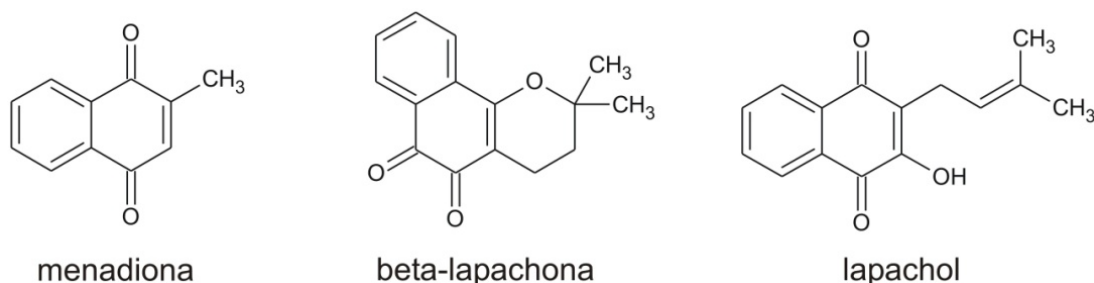


FIGURA 26 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS BENZENÓIDES MENADIONA,  $\beta$ -LAPACHONA E LAPACHOL  
FONTE: O autor (2011)

A lapachona apresenta efeito anti-inflamatório, inibe a proliferação e induz a apoptose, e ainda apresenta atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral e toxicidade contra *Trypanossoma cruzi* (DOCAMPO, 1977; DOCAMPO, 1979; GONÇALVES, 1980; MOON, 2007; TWARDOWSCHY, 2008; BOURGUIGNON, 2009).

O lapachol mostra atividades anti-inflamatória, gastroprotetora, antibacteriana, antifúngica, antiviral e também atividade contra o carcinosarcoma intramuscular de Walker. Em diferentes estudos foram avaliadas as atividades contra *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*, *Artemia salina* e *Tilapia nilótica*. Contra larvas de terceiro ínstar de *A. aegypti* o lapachol mostrou um  $CL_{50}$  de 26,3  $\mu$ g/mL em 24 horas de exposição (STEINERT, 1995; LIMA, 2002; SACA, 2003; DE ANDRADE-NETO, 2004; RODRIGUES, 2005; SILVA, 2005; TWARDOWSCHY, 2008).

### 3.5.9 *Thymus vulgaris*

A espécie é popularmente conhecida como tomilho ou *thyme*. O *Thymus vulgaris* (FIGURA 27) é nativo do mediterrâneo e presente abundantemente em países como França, Espanha, Portugal, Itália, Argélia e Marrocos, mas também é cultivado em outras partes da Europa, América-do-Norte, norte asiático e Oceania.



FIGURA 27 - REPRESENTAÇÃO DE *Thymus vulgaris*  
NOTA: (a) Flores de (b) *Thymus vulgaris*, conhecida popularmente como tomilho.

Produtos com tomilho têm sido usados na medicina humana e recentemente na medicina veterinária. O óleo essencial do tomilho é usado devido ao seu aroma e também como um agente antimicrobiano e antioxidante. Os constituintes do tomilho são usados como aditivos cosméticos e também como conservantes (MEWES, 2008).

Já foram isolados diferentes compostos da espécie. Do óleo essencial foram identificados compostos como o timol, carvacrol, linalol, geranial, geraniol, c-terpineno, mirceno, p-cimeneno,  $\beta$ -cariofileno, acetato de geranil, acetato de terpinil, neral, nerol,  $\alpha$ -terpinol (MEWES, 2008).

Dentre os compostos presentes no tomilho, o timol e o carvacrol são os de interesse farmacêutico. Esses fenóis podem influenciar no crescimento de vírus e bactérias (MEWES, 2008).

As atividades biológicas do tomilho já descritas são contra o *Trypanosoma cruzi* (SANTORO, 2007).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DAS ESPÉCIES E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A escolha das espécies botânicas foi realizada de acordo com os seus metabólitos potencialmente ativos para as larvas de *Aedes aegypti* através de pesquisa na literatura e histórico de pesquisa no LQBB com as espécies *Annona muricata* e *Melia azedarach*.

Após a coleta ou aquisição comercial/ doação das espécies, as partes botânicas adquiridas foram processadas como está descrito a seguir e armazenadas secas em temperatura de -15 °C em *freezer*.

#### 4.1.1 *Annona muricata*

As sementes de *Annona muricata* (graviola) foram fornecidas e enviadas no mês de maio de 2006 pela empresa BRASFRUT, situada no município de Feira de Santana – BA. Após o recebimento, as sementes foram secas ao ar livre por dois dias.

#### 4.1.2 *Ilex paraguariensis*

As folhas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) foram coletadas de uma árvore nativa adulta, cultivada em pleno sol na propriedade de Joaquim Cruz – Comunidade de Cocho Grande – Município de Nova Laranjeiras – PR, no mês de julho de 2008. Após a coleta, as folhas de erva-mate foram processadas na Indústria Becker Madeiras e Erva-Mate – Laranjeiras do Sul – PR. A exsicata foi depositada no Museu Botânico Municipal, sob número de identificação MBM 358115.

#### 4.1.3 *Melia azedarach*

Os frutos maduros de *Melia azedarach* (cinamomo) foram coletados das árvores presentes no sistema de arborização da cidade de Curitiba-PR, junto à Rua Urbano Lopes esquina com Rua Del. Leopoldo Belczek, no mês de maio de 2008. A seguir, os frutos foram lavados em água corrente com fricção manual para a retirada da polpa e as sementes obtidas foram secas ao ar livre durante dois dias. A exsicata foi depositada no Museu Botânico Municipal sob número de identificação MBM 48708.

#### 4.1.4 *Nicotiana tabacum*

As folhas de *Nicotiana tabacum* (fumo) foram coletadas no mês de janeiro de 2009, na propriedade de Lauro Schuster, comunidade Campo Sales, município de Laranjeiras do Sul-PR. Após a coleta, as folhas foram secas à sombra por aproximadamente três meses na mesma propriedade. As folhas foram identificadas pelo botânico Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica da UFPR.

#### 4.1.5 *Origanum vulgare*

As folhas secas de *Origanum vulgare* (orégano) foram adquiridas comercialmente no mercado municipal de Curitiba – PR, no mês de fevereiro de 2009.

#### 4.1.6 *Piper nigrum*

Os frutos maduros e secos de *Piper nigrum* (pimenta-do-reino preta) foram adquiridos comercialmente no mercado municipal de Curitiba-PR, no mês de fevereiro de 2009.

#### 4.1.7 *Plumbago capensis*

As folhas de *Plumbago capensis* (bela-emília) foram coletadas na propriedade de Joaquim Grzybowski, Sítio Araçá- Comunidade Km 127, município de Laranjeiras do Sul-PR, no mês de abril de 2009. Após a coleta, as folhas foram secas a sombra. A exsicata foi depositada no Museu Botânico Municipal sob número de identificação MBM 358113.

#### 4.1.8 *Tabebuia avellanedae*

As cascas trituradas de *Tabebuia avellanedae* (Ipê-roxo) foram recebidas da empresa Santosflora Comércio de Ervas Ltda, Lote IRCAP01/0108, fabricação 01/08.

#### 4.1.9 *Thymus vulgaris*

As folhas secas de *Thymus vulgaris* (tomilho) foram adquiridas comercialmente no mercado municipal de Curitiba-PR, no mês de fevereiro de 2009.

## 4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES

### 4.2.1 Trituração das partes botânicas

As sementes de *Melia azedarach* e *Annona muricata*, foram previamente trituradas em um liquidificador industrial e em seguida em um liquidificador comercial (Waring® commercial blender) no Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa (LQBB), Departamento de Farmácia – UFPR.

As folhas de *Ilex paraguariensis* e *Nicotiana tabacum* foram trituradas em moinho de facas no Laboratório de Farmacognosia – Departamento de Farmácia – UFPR.

As partes botânicas das outras espécies (*Piper nigrum*, *Plumbago capensis*, *Origanum vulgare*, *Tabebuia avellanedae* e *thymus vulgaris*) foram trituradas em liquidificador comercial no LQBB.

Todas as partes botânicas trituradas foram passadas por tamis ABNT/ASTM 12, Mesh 10 e abertura em mm/ $\mu$ m de 1,70 para garantir a homogeneidade das amostras.

### 4.2.2 Obtenção dos extratos etanólicos brutos

As partes botânicas previamente trituradas foram pesadas em lotes de 250 g e colocadas em contato com 1300 mL de etanol absoluto em um béquer com capacidade para 3000 mL. A seguir, levado a chapa de aquecimento até fervura incipiente (78 °C) e imediatamente filtrado a vácuo com auxílio de Kitassato e funil de Buchner com papel de filtro duplo. Os resíduos da filtração foram lavados com 300 mL de etanol absoluto quente. Os filtrados foram levados para o rotaevaporador (Laborota 4000; Heidolph, Germany) até a completa evaporação do solvente (WANDSCHEER, 2004).

#### 4.2.3 Fracionamento dos extratos etanólicos brutos

Os extratos etanólicos brutos foram fracionados em um sistema de filtração a vácuo, composto por um funil com placa porosa e um Kitassato, conforme esquema apresentado na FIGURA 28. Previamente, em um gral de porcelana foi realizada a mistura de 10 g de sílica gel 60 e 10 g de extrato bruto. Esta mistura foi adicionada na parte superior do funil contendo 50 g de sílica gel 60 Merck (0,063-0,200 mm). A seguir, foram realizadas eluições seqüenciais com 200 mL de cada solvente com polaridade crescente: Hexano, Clorofórmio, Acetato de Etila, Etanol e Metanol. Antes de aplicar o vácuo no sistema, o solvente foi deixado em contato com o extrato bruto por aproximadamente cinco minutos. Cada fração foi recolhida separadamente e os solventes foram evaporados em rotaevaporador (Laborota 4000; Heildolph, Germany).

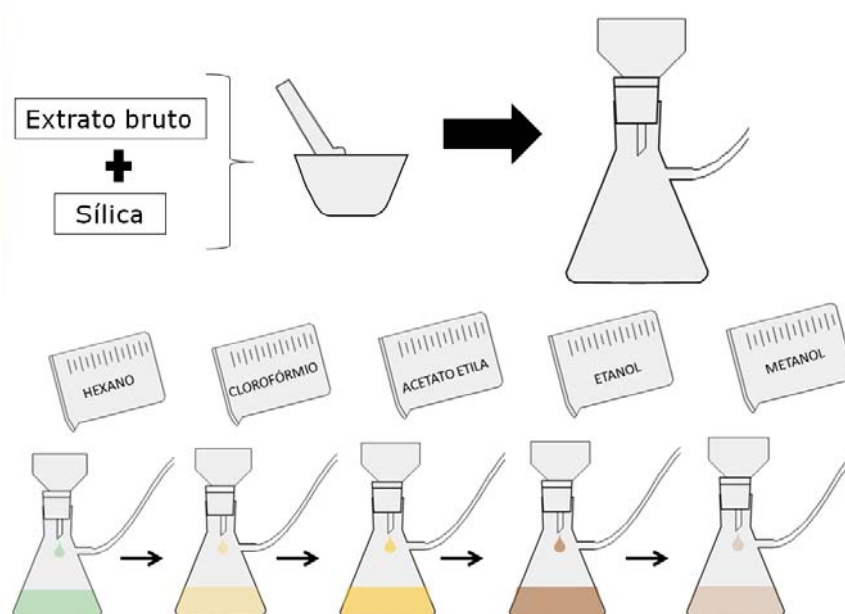


FIGURA 28 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS  
FONTE: O autor (2010)

#### 4.2.4 Subfracionamento das frações que apresentaram as melhores atividades frente aos náuplios de *Artemia salina*

O subfracionamento das frações que apresentaram as melhores atividades frente aos náuplios de *Artemia salina*, ou seja, fração etanol do extrato bruto de *A. muricata* e fração acetato de etila do extrato bruto *P. nigrum*, foi realizado em colunas de vidro (capacidade 40 mL), utilizando como fase estacionária 7,5 g de sílica 60 (Merck ,063-0,200 mm). Na parte superior da coluna foram colocadas 500 mg da fração previamente misturada com 2,5 g de sílica gel. A eluição foi realizada com um gradiente dos solventes utilizados no fracionamento anterior com polaridade anterior e posterior a fração (95:5→90:10→80:20→60:40→0:100), ou seja, para a fração etanol foi utilizando um gradiente de acetato de etila: metanol e para a fração acetato de etila o gradiente foi com clorofórmio: etanol. Foram eluídos 21 mL de cada mistura de solvente e coletadas quinze subfrações de 7 mL para cada fracionamento, em coletor de frações (Fraction collector FC 203B - Gilson®). Os solventes foram evaporados em concentrador de amostras (Centrivap concentrator – Labconco®) com temperatura de 40 °C durante 5 h.

#### 4.3 COMPOSTOS E AMOSTRAS DE REFERÊNCIA PARA OS BIOENSAIOS E METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Como não existem padrões de acetogeninas disponíveis comercialmente (Ex. annonacina), anteriormente no LQBB-UFPR foi obtida uma amostra bruta de acetogeninas polares (pAG) de sementes de *Annona muricata* trituradas utilizando três volumes de acetonitrila em agitador-incubador (Gyrotory Water Bath Shaker – G76) para uma extração durante 12 h, com temperatura de 28 °C. Este extrato foi purificado com carvão ativo e colunas de sílica gel (FONTANA, 1998). A análise da Cromatografia Líquida acoplada com Espectrômetro de Massa para íon negativo apresentou o pico principal esperado de 594,9 para annonacina e também os fragmentos do espectro massa-massa resultaram em fragmentos chave de 483,4 e 197,2 conforme espectros apresentados no ANEXO 1 (ALLEGREND, 2010). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Agilent 1100, bomba quaternária



G1311A, desgaseificador G1379A e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager) acoplado a um triplo quadrupolo (Applied Biosystems modelo API 3200) equipado com bomba de infusão (Havard 22 Apparatus) e fonte de ionização por eletrospray (ESI). Foi utilizada como fase móvel metanol: água acidificada 0,1 % com ácido fórmico (95:5) no modo isocrático, com fluxo de 200 µL/min, em uma coluna C<sub>18</sub> Waters® (7,5 X4,6 mm com tamanho de partícula de 3,5 µm) e a amostra foi previamente filtrada em filtro de seringa PVDF (11 mm, 0.45 µm, Millipore Millex) antes da injeção.

Os padrões de piperina (97% de pureza) e trioleína foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DAS ESPÉCIES SELECIONADAS

##### 4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada

A técnica de cromatografia em camada delgada foi utilizada para caracterizar os extratos brutos e suas frações/subfrações de *A. muricata* e *P. nigrum*. Como fase estacionária foram utilizadas placas de sílica gel 60 (Merck), com a distância origem até o final de 8 cm. Como fase móvel foi empregada a mistura hexano: clorofórmio: nitroetano: acetato de etila: acetona: metanol: acetonitrila: água (12:2:4:4:1:2:1,6:0,1). Como agentes reveladores foram utilizados anisaldeído sulfúrico a quente (1 g de anisaldeído, 5 mL de ácido sulfúrico e 90 mL de metanol) e o reativo de Kedde a frio (solução A – 3% de ácido 3,5-dinitrobenzóico e solução B- 5,7 % de hidróxido de potássio em etanol). As placas também foram visualizadas em câmara de UV (UVP – Chromato-VUE® C-70G UV viewing system), usualmente em comprimento de onda longo (365 nm). As imagens das cromatoplasmas foram adquiridas com câmera fotográfica (Sony CyberShot Smart Zoom DSC-P92) e as imagens foram analisadas em preto e branco pelo software ImageJ 1.44 para determinar o conteúdo relativo da área de cada mancha através da intensidade observada em uma escala de cinza.

#### 4.4.2 Espectrofotometria no UV-Vis

A técnica de espectrofotometria no UV-Vis (Shimadzu UV-1650 PC) foi utilizada no modo varredura (400 a 190 nm) com as amostras de referência, além dos extratos brutos, frações e subfrações de *A. muricata* e *P. nigrum*, com as soluções diluídas até 0,1 e 0,01 mg/mL em etanol, respectivamente. A partir das varreduras, foram selecionados os melhores comprimentos de onda para cada uma das espécies, os quais foram relacionados com as bioatividades através do coeficiente de Correlação de Pearson utilizando o *software* SPSS® Statistic (Versão 17.0.0).

#### 4.5 TESTE DE LETALIDADE EM NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

Para a avaliação preliminar da bioatividade e seleção dos extratos brutos e fracionados foi adaptada a metodologia que utiliza o microcrustáceo *A. salina* (MEYER, 1982). Os náuplios de *A. salina* foram obtidos a partir de 100 mg de cistos (Maramar Aquacultura Ltda) que foram colocados em contato com 100 mL de água do mar artificial descrita na TABELA 1 e oxigenação com porcelana porosa adaptada em uma bomba, luz lateral (lâmpada), durante 24-36 h, ilustrado na FIGURA 29.

TABELA 1 - FÓRMULA DA ÁGUA DO MAR ARTIFICIAL

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
NaCl	26,3 g
KCl	0,75 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,47 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,10 g
NaBr	0,08 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,21 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,20 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1 L

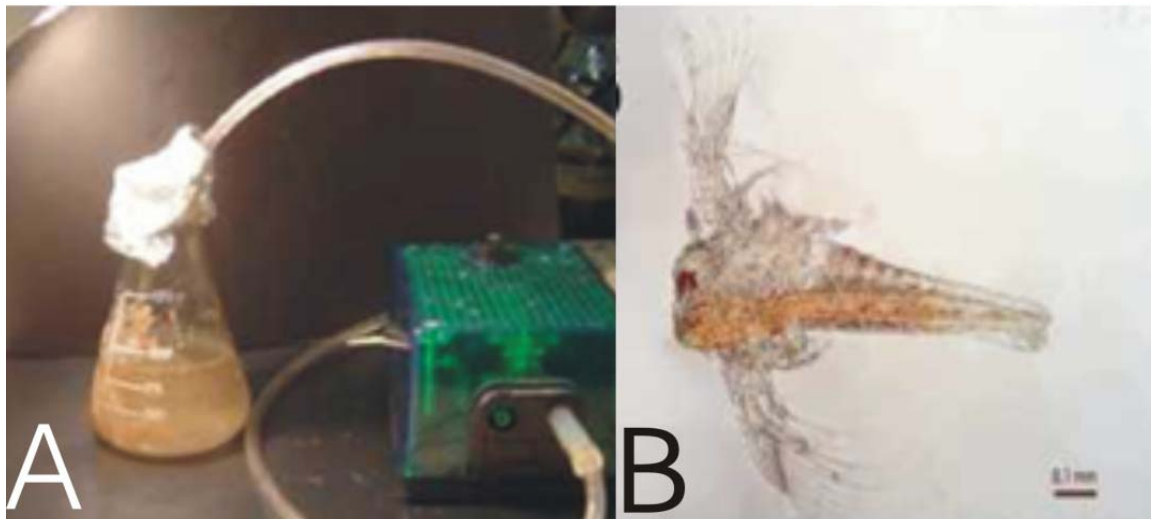


FIGURA 29 - TESTE DE LETALIDADE EM NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

NOTA: (A) Eclosão dos náuplios em água do mar, oxigenação e luz lateral. (B) Náuplio - microscópio Nikon 10X.

FONTE: O autor (2007)

Os náuplios com natação ativa foram divididos em grupos de 10 em poços de porcelana e transferidos para placas com 24 poços do tipo Falcon, contendo água do mar artificial e o extrato a ser avaliado dissolvido em etanol como veículo, num volume final de 2 mL. Foram utilizadas concentrações que variaram de 0,01 a 1000 µg/mL com quatro repetições cada uma. Cada experimento foi realizado três vezes. Para controle negativo foram utilizados poços contendo somente água do mar artificial ou etanol (2 % v/v), e como controle positivo foi utilizada a dose diagnóstica ( $DD = 2 \times CL_{99}$ ) do timol no valor de 92,54 µg/mL. A  $CL_{99}$  foi determinada a partir da curva dose-resposta do timol (ANEXO 2).

A contagem da taxa de mortalidade foi realizada após 24 h de exposição, com auxílio de uma lupa (Carl Zeiss – Stemi 2000 C) adaptada com uma placa com luz fria. Para auxiliar na visualização dos náuplios, foi adicionada de duas a três gotas de uma solução de azul de metileno (TABELA 2) nos poços para que houvesse um contraste entre os náuplios e o meio.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE AZUL DE METILENO

Solução aquosa de azul de metileno 1:5000	100,00 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 M	99,75 mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 M	0,25 mL
pH = 4,6	

Para as determinações das concentrações letais foram utilizadas as análises probit (FINNEY, 1981), utilizando o *software* SPSS® Statistic (Versão 17.0.0).

Para a seleção das subfrações foram realizadas comparações em concentrações específicas e as diferenças estatísticas foram analisadas através do teste de Tukey (One-Way ANOVA), com nível de significância de 0,05 utilizando o *software* SPSS® Statistic (Versão 17.0.0).

#### 4.6 BIOENSAIOS COM LARVAS DE *Aedes aegypti*

##### 4.6.1 Obtenção das larvas

A cepa “Rockfeller” de *A. aegypti* Linneaus 1762 (Diptera: Culicidae), foi cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ), originalmente obtida do CDC (*Center of Disease Control* – Porto Rico). A colônia do mosquito foi mantida no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (Depto de Zoologia – UFPR) a uma temperatura de 25 °C e umidade relativa de 80 % pela equipe do Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva.

As fêmeas adultas foram alimentadas com sangue de camundongo para estimular a oviposição em papel filtro. Os ovos adsorvidos em papel filtro foram colocados em bandejas plásticas com água mineral (Ouro Fino®) e dieta artificial para peixe (Tetramin®). As bandejas foram colocadas em estufa do tipo B.O.D com temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12 h, durante aproximadamente cinco dias, até as larvas atingirem o terceiro ínstar, com um tamanho de aproximadamente 4 mm.

##### 4.6.2 Determinação da atividade larvicida

Os bioensaios foram realizados conforme metodologia recomendada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), utilizando seis diferentes concentrações de cada extrato ou fração, conforme mostrado na FIGURA 30.

As soluções estoque foram normalizadas em etanol e adicionadas (1 mL) em potes plásticos (capacidade de 320 mL) contendo água mineral q.s.p 150 mL. Em

cada pote foram adicionadas 20 larvas em terceiro ínstar, sendo que para cada concentração foram realizadas quatro replicatas. Os potes foram levados a estufa do tipo B.O.D por 24h com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Como controles negativos foram utilizados potes contendo somente água ou uma solução aquosa etanólica (0,66 % v/v), representando o veículo da formulação. Como controle positivo foi utilizada uma solução de Temefós (0,006 µg/mL), correspondente a dose diagnóstica para a cepa Rockfeller (LIMA, 2003; PROPHIRO, 2008).

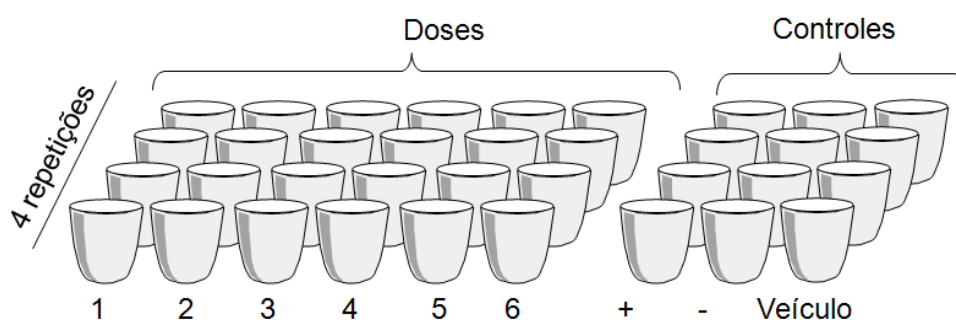


FIGURA 30 - ESQUEMA DOS BIOENSAIOS COM LARVAS DE *Aedes aegypti*  
 FONTE: O autor (2009)

Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram movimento após o toque com pipeta Pasteur. Para as determinações das concentrações letais foram utilizadas as análises probit (FINNEY, 1981), utilizando o *software* SPSS® Statistic (Versão 17.0.0).

#### 4.6.3 Análise morfológica

As larvas de *A. aegypti* foram comparadas entre os diversos tratamentos e foram visualmente analisadas em fotos sob lupa (Carl Zeiss – Stemi 2000 C - aumento de 4,5 x) e câmera fotográfica (Sonny CyberShot Smart Zoom DSC-P92) e conforme o tamanho calculado a partir da escala inserida nas fotografias através do *software* Corel Photo-Paint® 10 (Versão 10.410) e determinada com o auxílio de uma régua. Para a medição das larvas foi utilizado o BitRule Charten *Software* contendo uma régua virtual. As porcentagens de cada segmento do corpo foram determinadas com relação à média do tamanho total do corpo das larvas utilizadas

nos controles negativos (água e etanol). Conforme esquema apresentado na FIGURA 31, foram medidos os tamanhos da cabeça, cérvice ou cérvix (parte anterior ao tórax ou “pescoço”), tórax, abdômen e sifão respiratório.

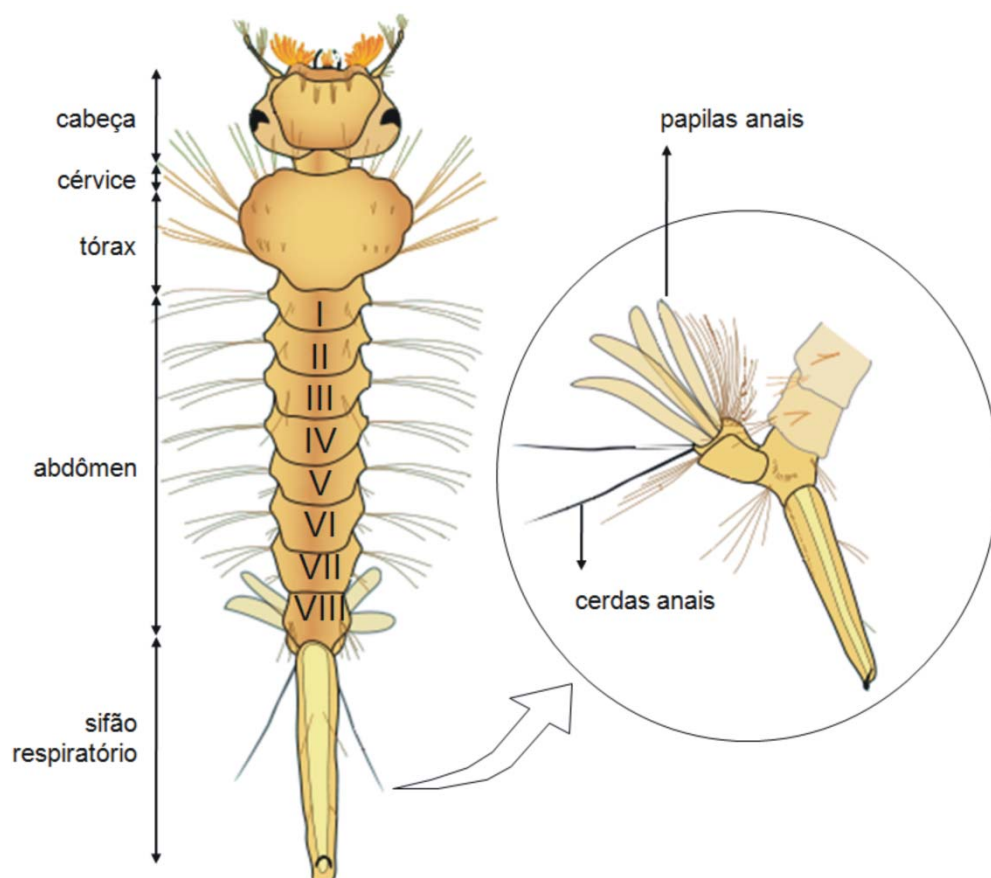


FIGURA 31 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*  
FONTE: Adp. (WIKIPEDIA, 2011)

Os resultados da mensuração foram submetidos à análise estatística ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes grupos através do teste de Tukey (One-Way ANOVA), utilizando o *software* SPSS® Statistic (Versão 17.0.0).

## 4.7 COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS E ANÁLISE DAS INTERAÇÕES

### 4.7.1 Teste de independência ( $\chi^2$ )

Para a avaliação das combinações dos extratos brutos através do teste de independência foi necessário avaliá-los individualmente em diferentes concentrações e determinar a mortalidade esperada ( $M_{ESP}$ ) através da EQUAÇÃO 1, onde  $M_1$  e  $M_2$  são as porcentagens de mortalidade observadas separadamente para *A. muricata* e *P. nigrum*, respectivamente (KOPPENHÖFER, 2003; MORALES-RODRIGUEZ, 2009). Para a avaliação através do teste de independência foram realizadas seis combinações larvicidas para cada modelo, *A. salina* e *A. aegypti*.

$$M_{ESP} = M_1 + M_2 \times \left(1 - \frac{M_1}{100}\right)$$

EQUAÇÃO 1 - DETERMINAÇÃO DA MORTALIDADE ESPERADA

A seguir, os resultados das mortalidades esperadas e mortalidades observadas ( $M_{OBS}$ ) nas combinações dos dois extratos, foram aplicados na EQUAÇÃO 2 para determinação do valor de  $\chi^2$  (BENZ, 1971; MCVAY, 1977; MORALES-RODRIGUEZ, 2009):

$$\chi^2 = \frac{(M_{OBS} - M_{ESP})^2}{M_{ESP}}$$

EQUAÇÃO 2 - DETERMINAÇÃO DO  $\chi^2$

Os resultados de  $\chi^2$  encontrados na equação foram comparados com os valores tabelados para grau de liberdade igual a 1. Os valores de  $\chi^2$  encontrados maiores que o tabelado significam que os dois extratos apresentaram um efeito não-aditivo simples, que pode ser tanto antagonismo como sinergismo. No caso de um efeito não-aditivo simples, foi preciso verificar a diferença entre  $M_{OBS} - M_{ESP}$ , resultando em um valor positivo ou negativo, para sinergismo ou antagonismo, respectivamente.

Adicionalmente, foi aplicado um teste  $t$  pareado entre os valores de  $M_{OBS}$  e  $M_{ESP}$ , utilizando o *software* SPSS® Statistic (Versão 17.0.0), para a verificação da existência de diferença estatística ( $p < 0,05$ ) (FARENHORST, 2010).

#### 4.7.2 Isoblograma/ concentração total

Com o intuito de refinar os resultados para verificar as melhores proporções larvicidas e a tendência de sinergismo das combinações dos extratos brutos de *A. muricata* (Am) e *P. nigrum* (Pn) foi utilizada uma segunda metodologia, denominada de isoblograma/ concentração total, onde são realizadas combinações a partir das curvas dose-resposta para cada extrato avaliado individualmente. Foram realizadas cinco combinações em diferentes proporções a partir de curvas dose-resposta de Am:Pn (10:90, 30:70, 50:50, 70:30 e 90:10) para cada modelo, *A. salina* e *A. aegypti*.

Para medir os efeitos das combinações foram utilizados os valores de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), que é o parâmetro mais utilizado para medir a atividade de drogas/ extratos em bioensaios. A partir das  $CL_{50}$  determinadas individualmente foi possível plotar um gráfico denominado de isoblograma (FIGURA 32) que é um método usualmente descrito na literatura onde a visualização das interações é facilmente observada. O isoblograma pode ser obtido plotando um gráfico cartesiano dos valores de  $CL_{50}$  dos extratos avaliados separadamente, com o extrato menos ativo em 'X' e o mais ativo em 'Y'. Unindo os valores das  $CL_{50}$  obtêm-se a linha de aditividade com seu respectivo intervalo de confiança (espaço em azul). Após avaliar as combinações entre os dois extratos, os valores de  $CL_{50}$  são plotados no gráfico. Quando o par das novas concentrações letais situar-se abaixo do intervalo de aditividade (espaço em verde), representa sinergismo entre os dois extratos/substâncias e quando situar-se acima deste intervalo (espaço em vermelho), antagonismo (THOMULKA, 1997; NAKORNCHAI, 2006; PARRY, 2006).



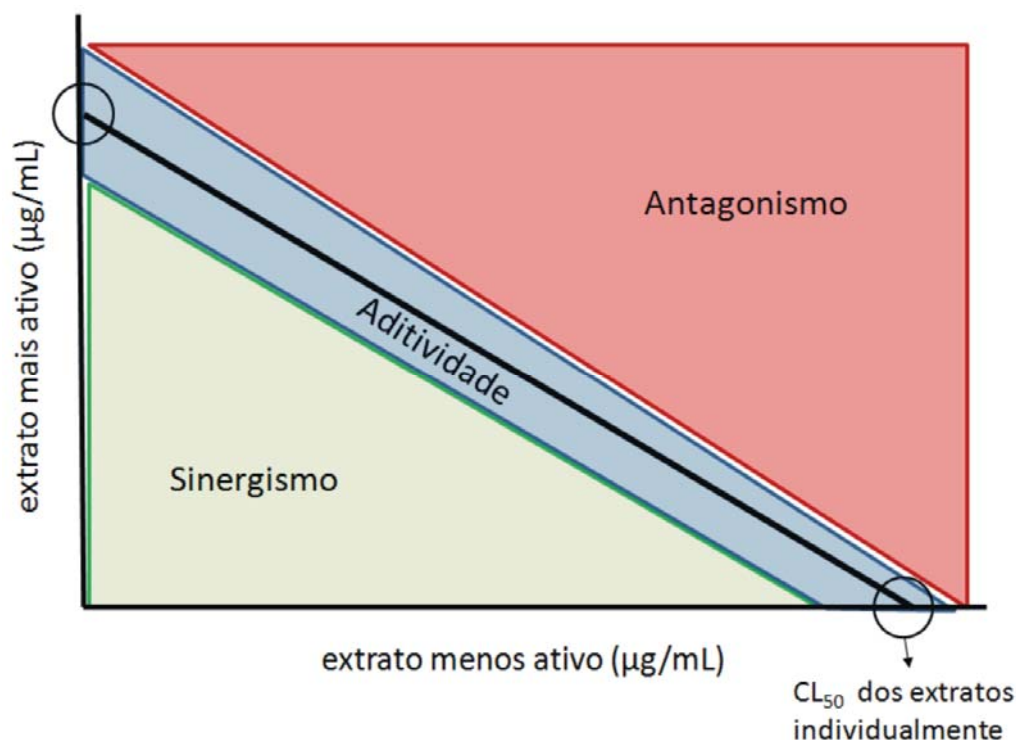


FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO DO ISOBOLOGRAMA  
 FONTE: O autor (2011)

Apesar do gráfico isobolograma indicar quais são os efeitos que existem entre os dois extratos foi necessário aplicar os valores de  $CL_{50}$  em equações para refinar os dados e comprovar numericamente as interações, além de possibilitar a construção de um novo gráfico que indica a tendência de interação entre os dois extratos.

Para estimar as interações entre os extratos brutos pelo método da isobolograma/ concentração total, foi necessário determinar as concentrações letais 50% ( $CL_{50}$ ) individuais e em combinação através de curvas dose-resposta. As  $CL_{50}$  dos extratos etanólicos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum* avaliados separadamente são descritas como  $z_1^*$  e  $z_2^*$ , respectivamente, enquanto as  $CL_{50}$  em combinação são denominadas de  $z_1$  e  $z_2$ . A partir destas  $CL_{50}$  determinadas foi possível obter o valor numérico de A através da seguinte EQUAÇÃO 3:

$$A = \frac{z_1}{z_1^*} + \frac{z_2}{z_2^*}$$

EQUAÇÃO 3 - DETERMINAÇÃO DO VALOR NUMÉRICO DE A

O valor numérico de A (ou  $\log A$ ) representa o tipo de interação que ocorre entre duas drogas/extratos e pode ser classificado em:

$A = 1$  ou  $\log(A) = 0$  (aditividade)

$A < 1$  ou  $\log(A) < 0$  (superaditividade ou sinergismo)

$A > 1$  ou  $\log(A) > 0$  (subaditividade ou antagonismo)

As cinco combinações larvicidas para cada modelo, *A. salina* e *Aedes aegypti*, foram experimentadas em proporções fixas a partir das curvas dose-resposta dos extratos brutos avaliados separadamente, com uma razão de potência obtida através de  $R = z_1^*/z_2^*$ . As proporções de cada extrato foram denominadas como  $p_1$  e  $p_2$ , para *A. muricata* e *P. nigrum*, respectivamente, onde  $p_1 + p_2 = 1$ .

A partir da EQUAÇÃO 3 e das proporções fixas dos extratos, é possível obter uma relação expressa em termos de concentração total ( $z_t$ ) de cada combinação:

$$A = z_t \left[ \frac{p_1}{z_1^*} + \frac{p_2}{z_2^*} \right] \text{ ou } z_t = \frac{Az_1^*}{[p_1(1-R)+R]}$$

EQUAÇÃO 4 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL

O valor de concentração total aditiva ( $z_{add}$ ) de cada combinação foi obtido utilizando a EQUAÇÃO 4 e o valor de  $A = 1$ . Para cada combinação, os valores de  $z_t$  e  $z_{add}$  foram comparados estatisticamente através de teste  $t$  pareado ( $p < 0,05$ ) utilizando o software SPSS® Statistic (Versão 17.0.0).

Aplicando logaritmo na EQUAÇÃO 4 obtemos:

$$\log(z_t) = \log(A) + \log(z_1^*) - \log[p_1(1 - R) + R]$$

EQUAÇÃO 5 - LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL

Baseado na EQUAÇÃO 5 foi possível plotar um gráfico (FIGURA 33) relacionando as proporções de  $p_1$  versus o log das concentrações totais ( $z_t$  ou  $z_{add}$ ), que resulta em uma curva não-linear, visualmente informativa para a comparação das diferenças entre as concentrações totais e tendência das interações (TALLARIDA, 1995). Se os valores plotados da concentração total,  $z_t$ , corresponderem à curva de  $z_{add}$ , as combinações serão aditivas (espaço em azul). Se os valores de  $z_t$  se situarem acima da curva de  $z_{add}$ , as combinações serão antagônicas (espaço em vermelho) e se a curva  $z_t$  estiver abaixo, as combinações serão sinérgicas (espaço em verde).

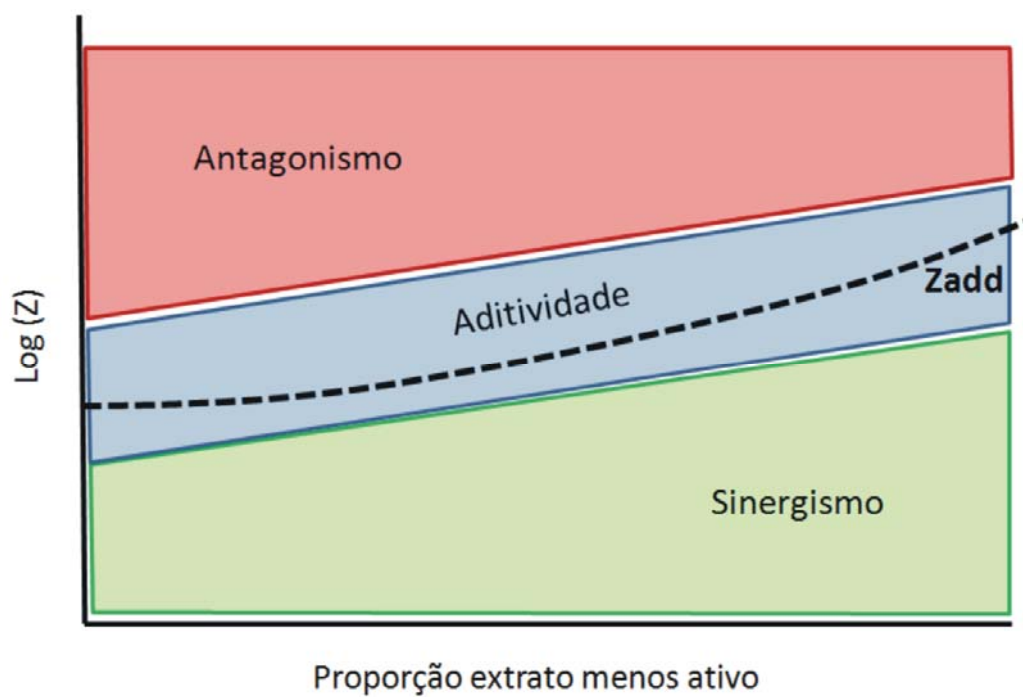


FIGURA 33 - REPRESENTAÇÃO DO GRÁFICO DE  $\text{Log}(z)$  VERSUS PROPORÇÃO DO EXTRATO MENOS ATIVO  
 FONTE: O autor (2011)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES BOTÂNICAS

#### 5.1.1 Rendimento dos extratos etanólicos brutos e frações

Na TABELA 3 estão descritos os rendimentos dos extratos etanólicos brutos das espécies:

TABELA 3 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS

<b>Espécie</b>	<b>Parte botânica utilizada</b>	<b>Rendimento do extrato bruto (g/100 g de planta seca)</b>
<i>Annona muricata</i>	semente	20,4
<i>Ilex paraguariensis</i>	folha	11,6
<i>Melia azedarach</i>	semente	8,4
<i>Nicotiana tabacum</i>	folha	15,1
<i>Origanum vulgare</i>	folha	12,2
<i>Piper nigrum</i>	fruto	8,6
<i>Plumbago capensis</i>	folha	7,3
<i>Tabebuia avellanedae</i>	casca	7,6
<i>Thymus vulgaris</i>	folha	21,0

Os maiores rendimentos em relação a 100 g de planta seca foram das espécies *Annona muricata*, *Nicotiana tabacum* e *Thymus vulgaris*.

Os rendimentos dos fracionamentos dos extratos brutos das espécies em estudo estão ilustrados na FIGURA 34 a seguir:

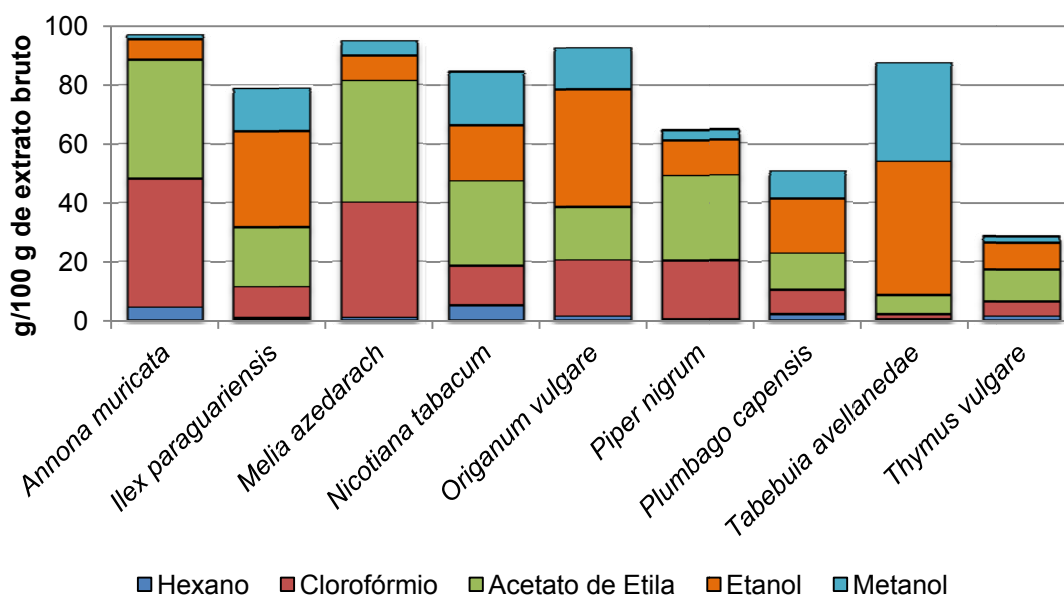


FIGURA 34 - RENDIMENTOS DOS FRACIONAMENTOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS

A fração hexano representa o menor rendimento na grande maioria das espécies, provavelmente devido ao tipo de extração primária (etanol, um solvente polar) e a eluição inicial com um solvente totalmente apolar, o hexano.

Para as espécies *A. muricata* e *Melia azedarach* as frações onde os rendimentos foram maiores são nas frações clorofórmio e acetato de etila, provavelmente devido à parte botânica utilizada ser semente, que normalmente contém um alto conteúdo lipofílico, o que explica estes maiores rendimentos nestas frações menos polares.

A espécie com maiores rendimentos nas frações mais polares, etanol e metanol, é a *Tabebuia avellanedae*, devido à parte utilizada ser cascas de caule e com um teor reduzido de óleos (TAGs).

As espécies onde os maiores rendimentos se dão nas frações com polaridade intermediária (acetato de etila) com tendência a maior polaridade (etanol) são: *Illex paraguariensis*, *Nicotiana tabacum*, *Thymus vulgaris* e *Plumbago capensis*.

Já a espécie *Origanum vulgare* apresenta as frações com alto rendimento que se distribui de frações menos polar (clorofórmio), intermediária (acetato de etila), a mais polar (etanol e metanol).

A espécie *Piper nigrum* apresenta uma distribuição de rendimento na fração menos polar (clorofórmio) até a intermediária (acetato de etila).

### 5.1.2 Teste de letalidade em náuplios de *Artemia salina* das diferentes espécies botânicas

A seguir, na TABELA 4, estão descritos os resultados dos testes de letalidade em náuplios de *A. salina* dos extratos brutos das nove espécies botânicas selecionadas e suas cinco respectivas frações. Os extratos e/ou frações foram avaliados em três diferentes concentrações, 10, 100 e 1000 µg/mL, segundo (MEYER, 1982).

A espécie *A. muricata* apresentou excelentes resultados frente aos náuplios de *A. salina*, tanto no extrato etanólico bruto das sementes quanto nas frações com tendência a polaridade, ou seja, frações acetato de etila, etanol e metanol. Já as frações menos polares, hexano e clorofórmio, não demonstraram atividade significativa em nenhuma das concentrações avaliadas. A fração etanol apresentou alta atividade em todas as concentrações, sobretudo em 10 µg/mL, onde houve diferença estatística em relação às demais frações. Esta maior atividade nas frações mais polares deve-se provavelmente aos compostos bioativos presentes nestas frações, tais como as acetogeninas serem facilmente solúveis nestes solventes como etanol, metanol, entre outros (por conta dos vários grupos hidroxilas que compensam a hidrofobicidade das longas cadeias hidrocarbonadas de ácidos graxos) e por serem fracamente solúveis nos extremos de apolaridade (hexano) e de polaridade (água) (GU, 1995).

O extrato etanólico bruto das folhas de *Ilex paraguariensis* apresentou atividade moderada com mortalidade em torno de 50 % apenas na concentração de 1000 µg/mL. O fracionamento deste extrato levou a um pequeno aumento na atividade apenas na fração com polaridade intermediária, acetato de etila, que teve diferença estatística em relação às demais frações principalmente na concentração de 10 µg/mL.

TABELA 4 - EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS E FRAÇÕES DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS AVALIADOS CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

Espécie botânica	Fração	Mortalidade (%)					
		10 µg/mL		100 µg/mL		1000 µg/mL	
<i>Annona muricata</i>	Ext. bruto	51 (± 1,69)	c	100	c	100	c
	Hexano	0	a	0	a	6,16 (±0,17)	a
	Clorofórmio	0	a	0	a	10 (±0,50)	b
	Ac. de etila	18,13 (± 1,39)	b	88,52 (± 6,12)	b	100	c
	Etanol	94,24 (±4,62)	d	100	c	100	c
	Metanol	22 (± 2,16)	b	100	c	100	c
<i>Ilex paraguariensis</i>	Ext. bruto	0	a	7,27 (± 4,67)	a,b	52 (± 9,37)	c,d
	Hexano	0	a	0	a	0	a
	Clorofórmio	0	a	0	a	0	a
	Ac. de etila	14,85 (± 5,65)	b	22,22 (±5,67)	b	63,84 (± 9,34)	d
	Etanol	0	a	13,96 (± 7,95)	a,b	38,33 (± 9,83)	b,c
	Metanol	0	a	17,44 (± 6,91)	b	23,86 (± 6,37)	b
<i>Melia azedarach</i>	Ext. bruto	0	a	63,72 (± 9,01)	c	96,67 (4,92)	b
	Hexano	0	a	0	a	0	a
	Clorofórmio	0	a	0	a	0	a
	Ac. de etila	0	a	85,62 (± 12,87)	c,d	100	b
	Etanol	0	a	95 (± 6,74)	d	100	b
	Metanol	0	a	31,28 (± 10,65)	b	100	b
<i>Nicotiana tabacum</i>	Ext. bruto	0	a	7,5 (± 5)	b	17,14 (± 9,51)	b
	Hexano	0	a	0	a	0	a
	Clorofórmio	0	a	0	a	0	a
	Ac. de etila	0	a	1,25 (± 3,54)	a,b	20,44 (± 7,14)	b
	Etanol	0	a	0	a	12 (± 4,47)	a,b
	Metanol	0	a	0	a	0	a
<i>Origanum vulgare</i>	Ext. bruto	9,17 (± 1,44)	a	17,94 (± 13,88)	b,c	85 (± 6,74)	c
	Hexano	0	a	0	a	0	a
	Clorofórmio	0	a	0	a	8,47 (± 4,47)	a
	Ac. de etila	40,85 (± 12,33)	b	63,18 (± 11,99)	c	90,63 (± 9,29)	c
	Etanol	14,18 (± 7,96)	a	38,15 (± 6,26)	b	66,67 (± 5,77)	b
	Metanol	0	a	36 (± 8,94)	b	54,76 (± 5,43)	b
<i>Piper nigrum</i>	Ext. bruto	100	c	100	a	100	a
	Hexano	0	a	100	a	100	a
	Clorofórmio	100	c	100	a	100	a
	Ac. de etila	100	c	100	a	100	a
	Etanol	100	c	100	a	100	a
	Metanol	55,60 (± 2,70)	b	100	a	100	a
<i>Plumbago capensis</i>	Ext. bruto	0	a	0	a	0	a
	Hexano	0	a	0	a	0	a
	Clorofórmio	0	a	0	a	0	a
	Ac. de etila	0	a	0	a	0	a
	Etanol	0	a	0	a	0	a
	Metanol	0	a	0	a	0	a
<i>Tabebuia avellanedae</i>	Ext. bruto	0	a	0	a	0	a
	Hexano	0	a	0	a	0	a
	Clorofórmio	0	a	0	a	71,58 (± 10,53)	b
	Ac. de etila	0	a	7,39 (± 4,57)	b	100	c
	Etanol	0	a	0	a	0	a
	Metanol	0	a	0	a	0	a
<i>Thymus vulgaris</i>	Ext. bruto	14 (± 5,48)	a,b	19,31 (± 7,71)	b	93,57 (± 8,42)	c
	Hexano	0	a	22,60 (± 5,20)	b	100	c
	Clorofórmio	12,23 (± 7,03)	a,b	15,12 (± 5,80)	a,b	100	c
	Ac. de etila	16,57 (± 7,59)	b	16,72 (± 8,95)	a,b	100	c
	Etanol	6,25 (± 5,18)	a,b	21,41 (± 6,48)	b	36 (± 13,42)	b
	Metanol	0	a	0	a	7,82 (± 4,39)	a
Controles	Positivo	100					
	Negativo	0					

NOTA: n=120; média (± desvio padrão); as letras representam diferença estatística determinada pelo Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; controle positivo = timol (92,54 µg/mL); controle negativo = etanol (2 % v/v).

Para a espécie *Melia azedarach*, o extrato etanólico bruto das sementes e as frações acetato de etila, etanol e metanol apresentaram atividade nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL. O aumento na atividade foi mais evidente nas frações acetato de etila e etanol, com polaridade intermediária tendendo a polaridade. Os compostos bioativos comumente presentes nesta espécie, os triterpenóides ou limonóides devem provavelmente estar presentes nestas frações.

Tanto o extrato etanólico bruto das folhas de *Nicotiana tabacum*, como as frações acetato de etila e etanol apresentaram atividade apenas na maior concentração avaliada, 1000 µg/mL, sendo a mortalidade abaixo de 50% e portanto, não são consideradas ativas (MEYER, 1982).

A espécie *Origanum vulgare*, apresentou atividade no extrato etanólico bruto das folhas e nas frações acetato de etila e etanol, sendo que a fração acetato de etila teve a maior atividade em todas as concentrações.

O extrato etanólico bruto dos frutos de *Piper nigrum* apresentou 100 % de mortalidade em todas as concentrações avaliadas. O fracionamento mostrou que a atividade está presente em todas as frações, sobretudo em clorofórmio, acetato de etila e etanol, que também apresentaram 100 % de mortalidade em todas as concentrações avaliadas. Logo, *P. nigrum*, seguida de *A. muricata*, se revelaram potencialmente mais bioativas contra os náuplios de *A. salina*.

Tanto o extrato etanólico bruto das folhas de *Plumbago capensis*, como as frações não apresentaram atividade frente aos náuplios de *A. salina* em nenhuma das concentrações avaliadas.

O extrato etanólico bruto das cascas de *Tabebuia avellanedae* não apresentou atividade em nenhuma das concentrações avaliadas. Porém, o fracionamento mostrou que há alguma atividade nas frações clorofórmio e acetato de etila, mas na concentração mais elevada de 1000 µg/mL.

Para a espécie de *Thymus vulgaris*, o extrato etanólico bruto das folhas apresentou atividade em *A. salina*. O fracionamento levou a atividades semelhantes à do extrato bruto nas frações clorofórmio, acetato de etila e etanol.

Na FIGURA 35 estão ilustrados, de forma mais visual e comparativa, os resultados do teste de letalidade em náuplios de *A. salina* dos extratos etanólicos brutos das diferentes espécies botânicas avaliadas.



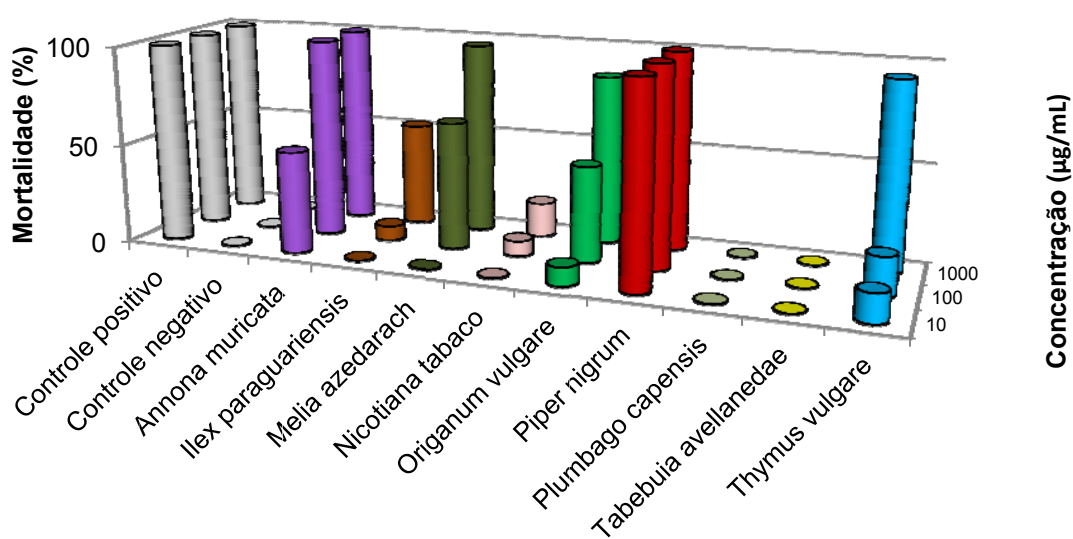


FIGURA 35 – ATIVIDADE DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

NOTA: n=120, controle positivo = timol (92,54 µg/mL); controle negativo = etanol (2 % v/v).

Na concentração de 1000 µg/mL, os extratos que apresentaram as maiores atividades foram das espécies *Annona muricata*, *Melia azedarach*, *Origanum vulgare*, *Piper nigrum* e *Thymus vulgaris*. Já na concentração de 100 µg/mL as espécies que se destacaram foram *Annona muricata* e *Piper nigrum*, seguido das espécies *Melia azedarach* e *Origanum vulgare*. E na menor concentração, 10 µg/mL, *Annona muricata* e *Piper nigrum*, novamente se destacaram, e foram selecionadas para dar continuidade aos demais experimentos, então contra larvas do mosquito *A. aegypti*.

## 5.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS, CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DE *Annona muricata*

### 5.2.1 Extrato etanólico bruto de *Annona muricata*

As concentrações letais do extrato etanólico bruto das sementes de *A. muricata* e a amostra de pAG (acetogeninas polares) para náuplios *A. salina* e larvas de *A. aegypti* são mostrados na TABELA 5. Os efeitos observados foram expressos

em CL (concentração letal) obtidos pela análise de Probit com limite de confiança de 95%.

TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES LETAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DAS SEMENTES DE *Annona muricata* E AMOSTRA DE ACETOGENINAS POLARES PARA NÁUPLIOS DE *Artemia salina* E LARVAS DE 3º ÍNSTAR DE *Aedes aegypti*

	<i>Artemia salina</i>		<i>Aedes aegypti</i>	
	Extrato bruto	pAG	Extrato bruto	pAG
<b>CL<sub>2</sub></b>	2,27 (1,06 - 3,52)	0,36 (0,08 - 0,56)	7,74 (2,43 - 14,88)	0,01 (0,00 - 0,01)
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>10,20</b> <b>(7,52 - 13,77)</b>	<b>0,92</b> <b>(0,64 - 1,37)</b>	<b>93,48</b> <b>(73,97 - 109,74)</b>	<b>0,65</b> <b>(0,48 - 0,87)</b>
<b>CL<sub>99</sub></b>	56,06 (35,03 - 127,32)	2,64 (1,65 - 14,93)	1571,11 (914,32 - 4082,11)	144,63 (68,72 - 388,47)

NOTA: Concentrações letais (µg/mL) obtidas a partir de seis concentrações diferentes e n=40 para *Artemia salina* e n=80 para *Aedes aegypti*; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controles positivos = 100 % de mortalidade; controles negativos = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade; pAG – amostra de acetogeninas polares.

Estudos anteriores utilizando extratos de *A. muricata* contra náuplios de *A. salina*, apresentaram CL<sub>50</sub> de 0,49 µg/mL para folhas e 210 µg/mL para sementes (LUNA, 2006) (ROJAS, 2004). O valor de CL<sub>50</sub> encontrado por nós foi de 10,20 µg/mL, demonstrando ser cerca de 20 vezes mais potente do que o descrito para as sementes.

Com relação à atividade em larvas de *A. aegypti*, indicam uma CL<sub>50</sub> de 60 (50-70) (BOBADILLA, 2005) e 900 (380-1300) µg/mL (HENAO, 2007), para extratos de sementes de *A. muricata* utilizando larvas de 4º instar de *A. aegypti*. Com o extrato previamente desengordurado com hexano, a CL<sub>50</sub> encontrada foi de 74,68 µg/mL para larvas de 3º e 4º instar (MORALES, 2004). Assim, o resultado por nós encontrado, CL<sub>50</sub> de 93, 48 µg/mL, está próximo do que já está descrito na literatura.

Para outra espécie do gênero, *A. squamosa* (fruta-do-conde), mais rica em esquamocina (ARAYA, 2002), ou seja, outra acetogenina que não a annonacina, encontrada principalmente em *A. muricata*, os extratos metanólicos de diferentes partes botânicas apresentaram CL<sub>50</sub> de 6,34, 1,49 e 0,15 µg/mL, respectivamente para casca do caule, folhas e sementes (PISUTTHANAN, 2004).

A FIGURA 36 mostra o perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto e da amostra de pAG das sementes de *A. muricata*, comparado com o padrão de trioleína. A cromatoplaça A (esquerda) que foi revelada com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento, mostra o perfil geral dos constituintes. O conteúdo

dominante visível de bandas violáceas (Rf 0,95) mostra os triacilgliceróis (TAGs) no extrato bruto, os quais praticamente não aparecem na amostra de pAG previamente purificada com carvão ativo e coluna de sílica gel. No extrato bruto ainda aparecem quantidades menores de uma família de acetogeninas com uma cor verde-acinzentada com Rf(s) 0,67, 0,41, 0,32 e 0,17. A terceira, (Rf 0,32) provavelmente se trata de annonacina, uma vez que esta é a principal acetogenina encontrada nas sementes de *A. muricata* (CHAMPY, 2002; CHAMPY, 2005). A placa B (direita) foi revelada com reagente de Kedde para a detecção específica de acetogeninas enquanto lactonas insaturadas, ou seja, uma forte reação fugaz vinho-rosada confirmou as interpretações acima mencionadas. A sobrecarga de amostra (10 e 20  $\mu$ L) também permitiu a detecção de pequenas contaminações de outras acetogeninas na amostra pAG, como por exemplo a que aparece com Rf 0,74.

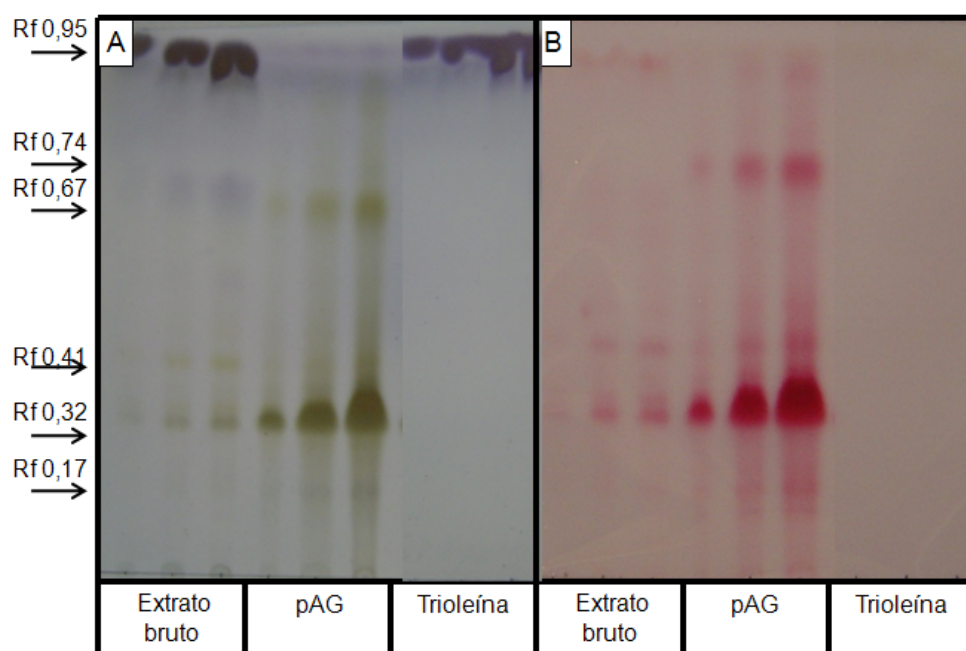


FIGURA 36 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E AMOSTRA DE ACETOGENINAS POLARES DAS SEMENTES DE *Annona muricata* E PIPERINA

NOTA: Aplicações em volumes crescentes de 1, 10 e 20  $\mu$ L de soluções a 10 mg/mL; (A) Anisaldeído sulfúrico após aquecimento; (B) Reativo de Kedde. ; pAG – amostra de acetogeninas polares.

Comparando-se as bioatividades do extrato bruto etanólico de *A. muricata* e a amostra pAG, nota-se para ambos, náuplios de *A. salina* e larvas de *A. aegypti*, um aumento na atividade na amostra pAG. Focando a CL<sub>50</sub>, o parâmetro mais usual de letalidade, o aumento foi de 144 e 11 vezes, respectivamente. O aumento na

atividade na amostra pAG é devido ao enriquecimento em acetogeninas, como evidenciado no perfil cromatográfico.

O eficiente mecanismo de ação das acetogeninas em vários modelos celulares e tissulares é explicado por uma inibição específica da respiração mitocondrial no complexo I (FIGURA 37). Assim, a inibição da NADH: Ubiquinona oxirredutase bloqueia a fosforilação oxidativa mitocondrial, ou seja, o bloqueio do elétron de transporte e não permite a conversão de ADP e fosfato inorgânico em ATP (GU, 1995; CARMEN ZAFRA-POLO, 1998; FONTANA, 1998).

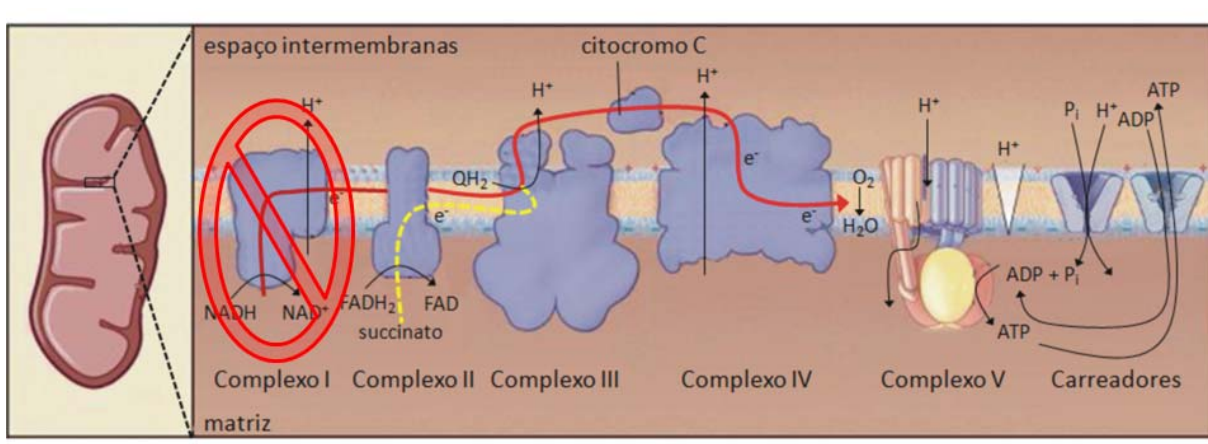


FIGURA 37 – COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL  
FONTE:Adp. (LIMA, 2010)

No que concernia a possibilidade de que os efeitos larvicidas pudessem estar precedidos de outras alterações, especial atenção foi prestada a quaisquer modificações da morfologia plena do corpo de larvas não tratadas quando comparadas com aquelas objeto dos bioensaios larvicidas. Na FIGURA 38 estão ilustrados os aspectos das larvas de *A. aegypti* controles, negativos e positivo, comparativamente às tratadas com o extrato etanólico bruto de *A. muricata* e com pAG.



FIGURA 38 - LARVAS DE *Aedes aegypti* CONTROLES E TRATADAS COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Annona muricata* E ACETOGENINAS POLARES

NOTA: (1) Água; (2) Etanol; (3) Temefós; (4) Extrato etanólico bruto de *A. muricata* e (5) pAG – amostra de acetogeninas polares.

FONTE: O autor (2010)

As larvas dos controles negativos (1-água e 2-etanol) apresentaram aspecto vermiforme e coloração branco-esverdeada com o corpo nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen. Tanto a cabeça quanto o tórax são globosos enquanto o abdômen apresenta nove segmentos, sendo o último diferenciado em lobo anal. Ligado ao VIII segmento, encontra-se o sifão respiratório (CONSOLI, 1994). As larvas dos controles negativos apresentaram um tamanho médio de 4,1 ( $\pm$  0,36) e 4,2 ( $\pm$  0,85) mm para água e etanol, respectivamente. As larvas tratadas com temefós apresentam o abdômen encurtado devido ao achatamento dos segmentos, com um tamanho médio de 3,4 ( $\pm$  0,41) mm. Por sua vez as larvas expostas tanto ao extrato bruto quanto à amostra pAG de *A. muricata* apresentam o corpo alongado, com tamanho médio 5,3 ( $\pm$  1,05) e 4,8 ( $\pm$  0,51) mm, respectivamente. Este alongamento é mais evidente no abdômen e no cérvice (parte anterior ao tórax ou “pescoço”). Nestas larvas também foi possível observar um escurecimento das regiões do tórax e abdômen. Tanto o surgimento do cérvice, quanto o escurecimento das larvas já foram relatadas anteriormente em um estudo utilizando óleo de *Carapa guianensis* (andiroba) e *Copaifera* sp. (copaíba) após 24 horas de exposição (PROPHIRO, 2008). Diferentemente dos modelos por nós explorados: graviola (*A. muricata*; acetogeninas) e pimenta-do-reino (*P. nigrum*; piperamidas), os óleos de

andiroba e copaíba são ricos em substâncias distintas, a saber respectivamente, limonóides ou terpenos complexos e sesqui- e di-terpenos.

Foram realizadas medições para uma análise morfológica comparativa entre os diferentes tratamentos utilizando dez larvas de cada grupo e os dados estão expostos na TABELA 6 em porcentagem com relação ao tamanho total do corpo, considerando como 100 % a média das larvas dos controles negativos.

Através do teste de Tukey foi possível perceber que não houve diferença estatística na morfologia das larvas dos controles negativos (água e etanol). Analisando o controle positivo, temefós, como já foi observado anteriormente houve um encurtamento no abdômen em torno de 20 % em relação aos controles negativos (água e etanol), levando a uma redução total do tamanho do corpo. Tanto as larvas tratadas com a amostra pAG (acetogeninas polares) e o extrato etanólico bruto de *A. muricata*, como já mostrado, houve o surgimento de cérvice e também um alongamento no abdômen na ordem de 8 e 18 %, respectivamente para pAG e extrato bruto, fazendo com que o tamanho das larvas fiquem obviamente maiores.

TABELA 6 - MEDIDAS DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* CONTROLES E TRATADAS COM ACETOGENINAS POLARES E O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Annona muricata*

Amostras/ Medidas (%)	Cabeça	Cérvice	Tórax	Abdômen	Sifão
<b>Água</b>	15,62 (±1,51) a	0,00 (±0,00) a	12,55 (±2,01) a	58,04 (±4,86) a,b	12,94 (±2,38) a
<b>Etanol</b>	16,09 (±1,17) a	0,00 (±0,00) a	12,19 (±2,18) a	61,32 (±8,68) a,b	12,89 (±3,54) a
<b>Temefós</b>	16,57 (±2,66) a	0,00 (±0,00) a	11,31 (±1,88) a	<b>40,07</b> <b>(±6,08)</b> a	10,23 (±2,53) a
<b>pAG</b>	14,94 (±1,54) a	<b>3,04</b> <b>(±0,82)</b> b	14,84 (±1,54) a	67,94 (±10,65) b	13,28 (±1,00) a
<b>Am Bruto</b>	13,99 (±3,05) a	<b>4,92</b> <b>(±1,70)</b> b	15,93 (±3,56) a	77,50 (±15,15) b	14,24 (±3,34) a

NOTA: n=10 para cada grupo; os valores entre parêntesis representam o desvio-padrão; as medidas foram realizadas em porcentagem considerando o tamanho médio do grupo controle negativo (água e etanol) como 100 %; as letras representam diferença estatística determinada pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ); pAG – amostra de acetogeninas polares.

Estas diferenças entre as partes do corpo das larvas nos tratamentos estão evidenciados na FIGURA 39, onde fica claro que não houve diferença entre as medidas do sifão respiratório, cabeça e tórax, porém nota-se alteração, para maior, no tamanho do abdômen e surgimento do cérvice.

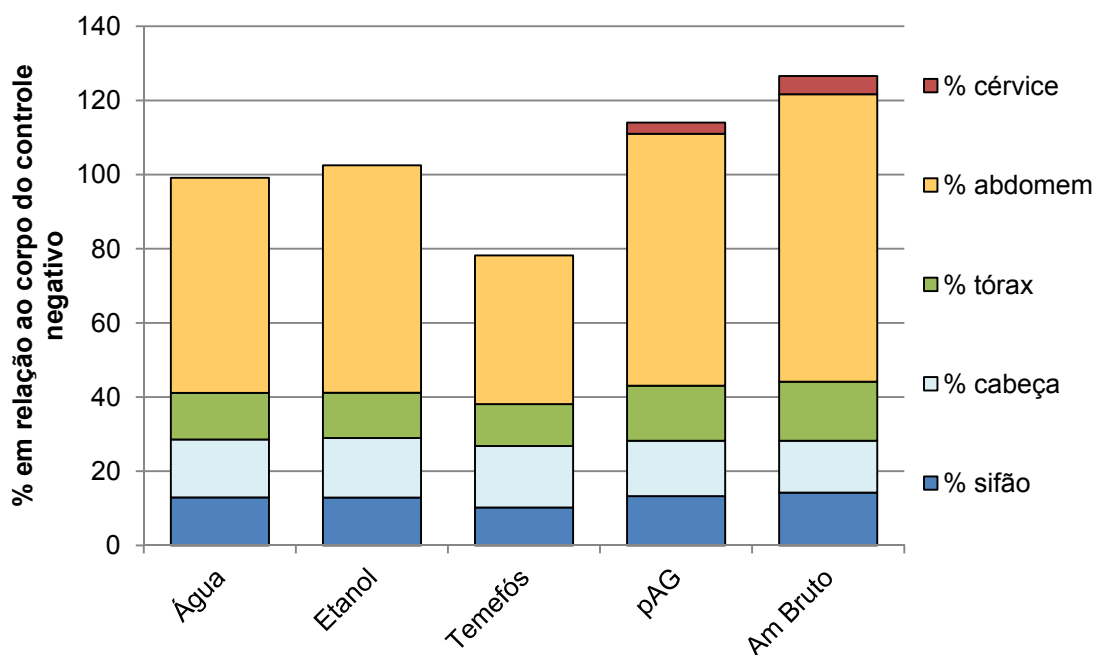


FIGURA 39 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM ACETOGENINAS POLARES E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Annona muricata*

### 5.2.2 Frações e subfrações do extrato etanólico bruto de *Annona muricata*

Na TABELA 7 estão descritas as concentrações letais das frações do extrato bruto de *A. muricata* para náuplios de *A. salina*. Para as frações hexano e clorofórmio, que apresentaram baixa mortalidade na concentração de 1000 µg/mL com valores de 6,16 e 10 %, respectivamente, e que não são consideradas ativas ( $CL_{50} > 1000\mu\text{g/mL}$ ), não foram realizadas curvas-dose resposta.

TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DE *Annona muricata* CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

	Acetato de etila	Etanol	Metanol
<b>CL<sub>2</sub></b>	4,32 (3,26 - 5,40)	0,06 (0,03 - 0,11)	4,93 (3,39 - 6,30)
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>32,15</b> <b>(28,52 - 36,70)</b>	<b>0,63</b> <b>(0,49 - 0,75)</b>	<b>16,46</b> <b>(13,94 - 20,10)</b>
<b>CL<sub>99</sub></b>	312,27 (225,54 - 474,76)	8,42 (6,22 - 12,93)	64,47 (45,08 - 115,00)

NOTA: Concentrações letais (µg/mL) obtidas a partir de seis concentrações diferentes e n=40; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controle positivo = timol (92,54 µg/mL) com 100 % de mortalidade; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.



O fracionamento do extrato bruto de *A. muricata* levou a um enriquecimento nas atividades frente *A. salina*, apresentando valores de CL<sub>50</sub> de 32,15, 0,63 e 16,46 µg/mL nas frações acetato de etila, etanol e metanol, respectivamente, menores que aquela de 93,48 µg/mL do extrato bruto.

Na FIGURA 40 estão mostrados os perfis cromatográficos do extrato etanólico bruto de *A. muricata* e suas frações:

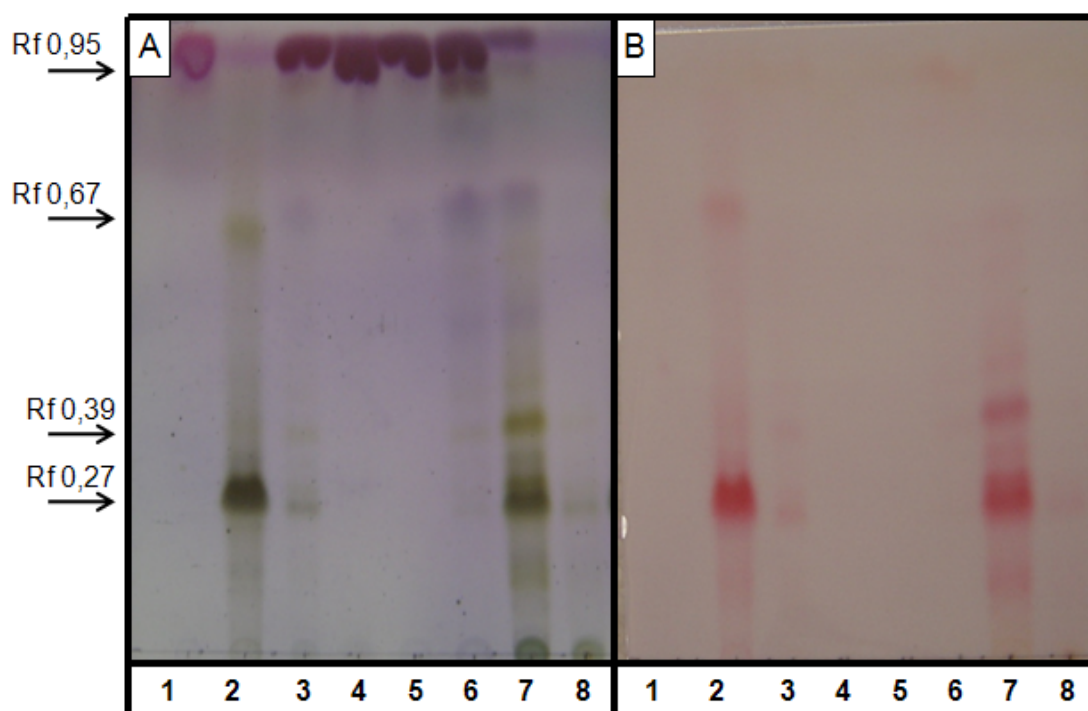


FIGURA 40 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Annona muricata* E SUAS FRAÇÕES, TRIOLEÍNA E ACETOGENINAS POLARES

NOTA: Aplicação de 10 µL de amostra a 10 mg/mL; (A) Anisaldeído sulfúrico após aquecimento; (B) Reagente de Kedde; (1) Trioleína; (2) pAG – amostra de acetogeninas polares; (3) Extrato bruto; (4) Fração hexano; (5) Fração clorofórmio; (6) Fração acetato de etila; (7) Fração etanol e (8) Fração metanol.

Na placa da esquerda (A) revelada com anisaldeído sulfúrico onde é possível perceber a presença de ácidos graxos na parte superior da corrida (Rf 0,95), principalmente no extrato bruto e frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, e mais fracamente na fração etanol. No extrato bruto e sobretudo na fração etanol, também é possível perceber a presença de acetogeninas que apresentam bandas esverdeadas (Rf 0,39, 0,27 e 0,13). A segunda placa (B) foi revelada com reativo de Kedde, específico para acetogeninas enquanto lactonas insaturadas, indicando sua presença principalmente na fração etanol (Rf 0,39, 0,27 e 0,13), onde podemos



observar bandas rosadas intensas. Com os perfis cromatográficos do extrato bruto e frações é possível relacionar com as atividades frente aos náuplios de *A. salina*, onde as frações em que aparecem as acetogeninas são justamente as frações com maior atividade, com destaque para a fração etanol que apresenta bandas mais intensas e a menor CL<sub>50</sub> (0,63 µg/mL), quando comparada às outras frações (16,46 a >1000 µg/mL).

Foram realizadas varreduras espectrofotométricas do extrato etanólico bruto de *A. muricata* e suas frações, quando foi possível perceber que os picos máximos de absorção do extrato bruto e frações estão situados entre 220 e 200 nm, conforme é demonstrado na FIGURA 41. No extrato bruto de *A. muricata*, bem como as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, os picos máximos foram em torno de 205 nm. Já para a fração etanol, o pico máximo se deu em 210 nm, correspondente à amostra pAG e coerente, portanto, com a descrição na literatura de que acetogeninas com  $\alpha$  e  $\beta$  insaturação exibem absorção no UV neste comprimento de onda (GU, 1995).

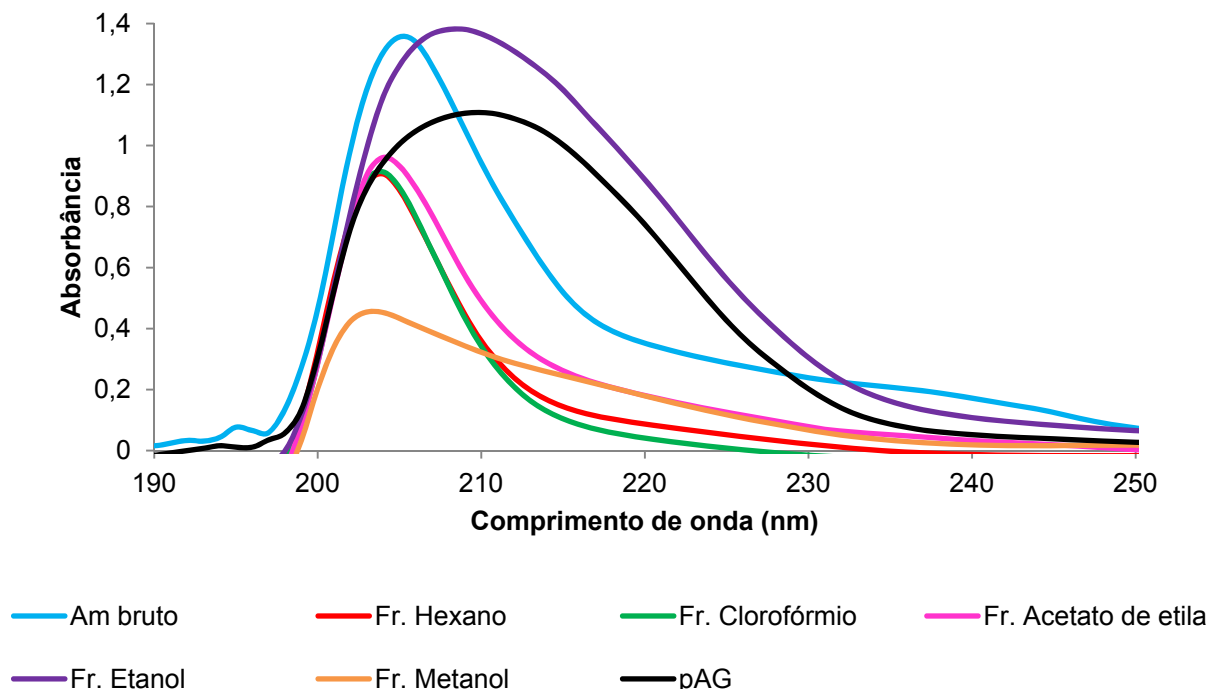


FIGURA 41 - ESPECTROS DE VARREDURA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Annona muricata* E A AMOSTRA DE ACETOGENINAS POLARES  
 NOTA: Soluções de leitura no espectrofotômetro a 0,1 mg/mL em etanol.

Com base no comprimento de onda máximo exibido no UV para pAG, foi confeccionada a FIGURA 42, que relaciona a absorção relativa das acetogeninas em 210 nm com as atividades em náuplios de *A. salina*.

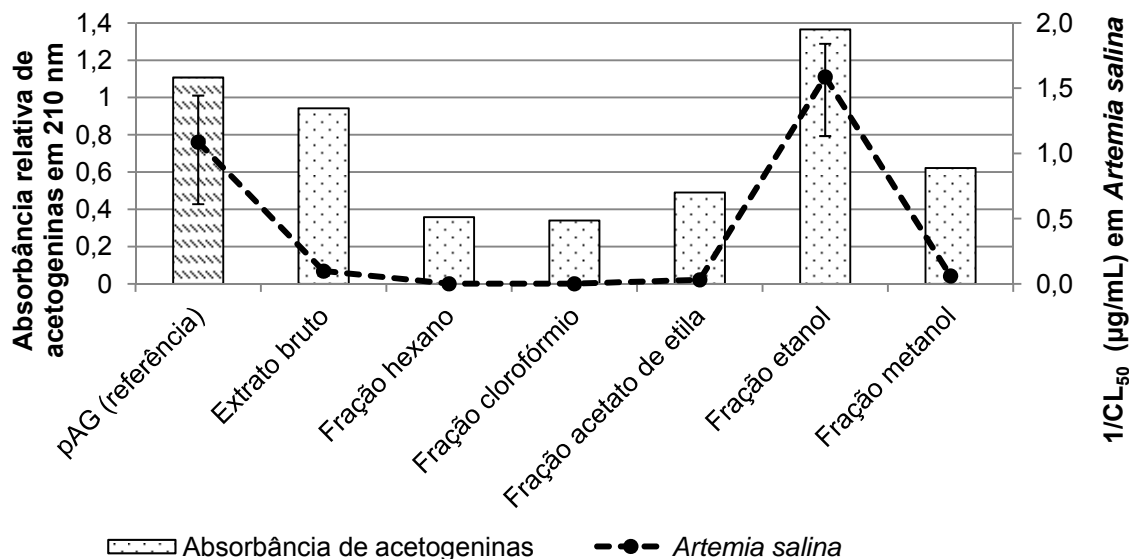


FIGURA 42 – RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E ATIVIDADE EM NÁUPLIOS DE *Artemia salina* DO EXTRATO ETANÓLICO E BRUTO E FRAÇÕES DE *Annona muricata* E ACETOGENINAS POLARES

NOTA: Absorbância em 210 nm e atividade representada por 1/CL<sub>50</sub> (µg/mL); Soluções de leitura no espectrofotômetro a 0,1 mg/mL em etanol; as barras de erro para *Artemia salina* representam o intervalo de confiança (95%) determinado pelo método Probit com n=40; pAG – amostra de acetogeninas polares.

É possível observar que o fracionamento do extrato bruto de *A. muricata* leva a um enriquecimento, na fração etanol, das atividades frente aos náuplios de *A. salina* (linha tracejada) e correspondente à maior absorbância relativa em 210 nm correspondente às acetogeninas, fato comprovado pelo coeficiente de correlação de Pearson que apresentou um valor elevado de 0,887.

Com a fração etanol que apresentou a maior bioatividade foi realizado um subfracionamento que resultou em quinze subfrações e os resultados do rendimento e teste de letalidade em náuplios de *A. salina* estão ilustrados na FIGURA 43 a seguir:

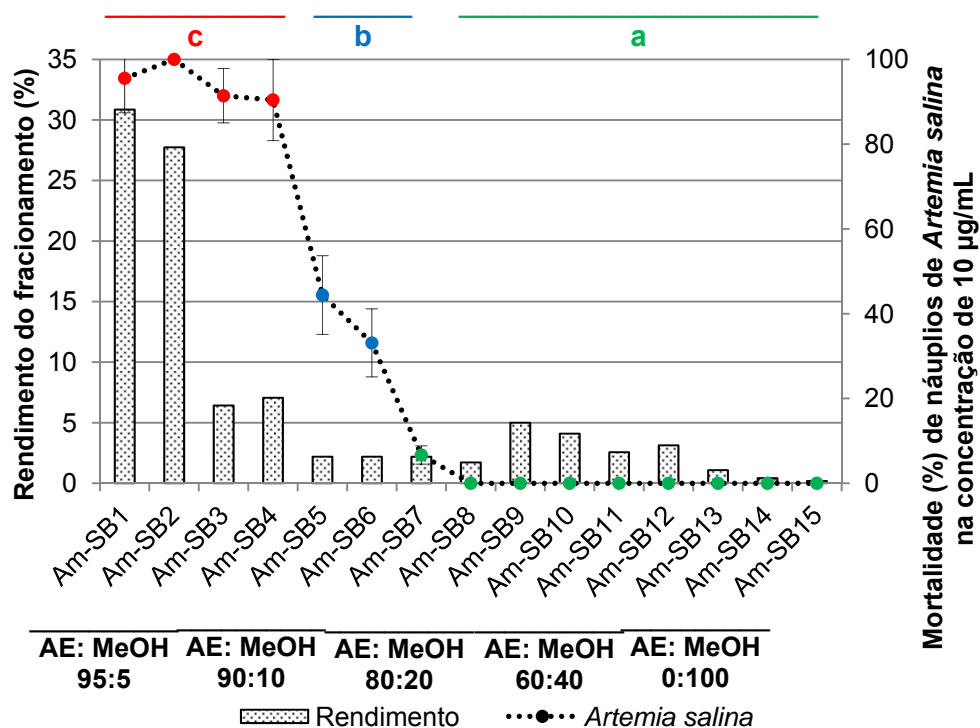


FIGURA 43 - RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO E MORTALIDADE DE NÁUPLIOS DE *Artemia salina* DAS SUBFRAÇÕES DA FRAÇÃO ETANOL DO EXTRATO BRUTO DE *Annona muricata*

NOTA: n=120 para o teste com *Artemia salina*, onde as barras representam o desvio padrão e as letras representam diferença estatística determinada pelo Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; controle positivo = timol (92,54  $\mu\text{g/mL}$ ) com 100 % de mortalidade; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.

As primeiras quatro subfrações foram as que apresentaram os maiores rendimentos com valores de 30,86, 27,74, 6,42 e 7,06 %, respectivamente para Am-SB1 a Am-SB4, correspondente a 72 % da recuperação da coluna, de um total de 96,88 % de recuperação. Os dados encontrados nas atividades em náuplios de *A. salina* correspondem ao perfil cromatográfico das subfrações, que está ilustrado na FIGURA 44, a seguir:

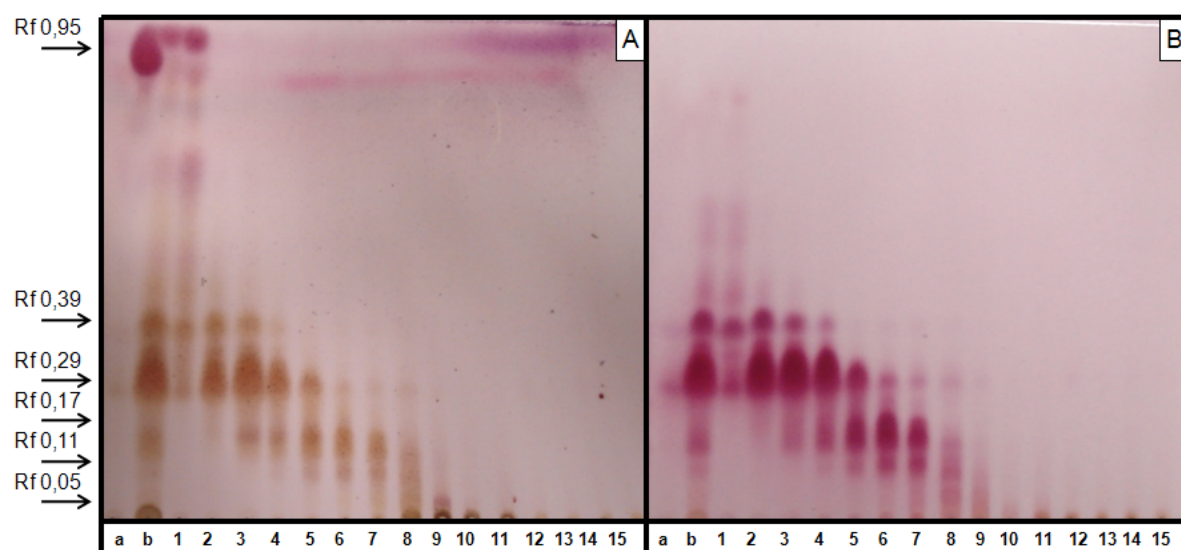


FIGURA 44 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS SUBFRAÇÕES DE *Annona muricata*  
 NOTA: (A) Revelação com anisaldeído sulfúrico. (B) Revelação com reativo de Kedde; (a) Extrato bruto de *A. muricata*; (b) Fração etanol; (1-15) Subfrações da fração etanol. Soluções 50 mg/mL (A- 6 spots, B-2 spots)

Na placa da esquerda revelada com anisaldeído, é possível perceber a presença de triacilgliceróis (Rf 0,95) na subfração Am-SB<sub>1</sub>, e também de acetogeninas com Rf(s) menores e coloração esverdeada até a subfração Am-SB<sub>9</sub>. A placa da direita que foi revelada com o reativo de Kedde e é onde podemos visualizar as acetogeninas enquanto lactona insaturadas nas subfrações Am-SB<sub>1</sub> a Am-SB<sub>9</sub>. Relacionando o grupo com maiores atividades (letra c no teste de Tukey) em *A. salina* e as bandas que aparecem nas cromatoplasas, a acetogenina com Rf 0,39 aparece nas subfrações Am-SB<sub>1</sub> a Am-SB<sub>4</sub>. A mancha com Rf 0,29 que como o maior destaque nestas frações, é visualizada no segundo grupo (letra b no teste de Tukey), ou seja, Am-SB<sub>5</sub> e Am-SB<sub>6</sub>.

A partir da imagem da placa revelada com o reativo de Kedde, após conversão em preto e branco, foram realizadas densitometrias das amostras que compara a distância na corrida com a intensidade do sinal das bandas em uma escala de cinza (método ImageJ). Foram calculadas as áreas de cada mancha e os dados comparados com as mortalidades para náuplios de *A. salina* estão representados na FIGURA 45:

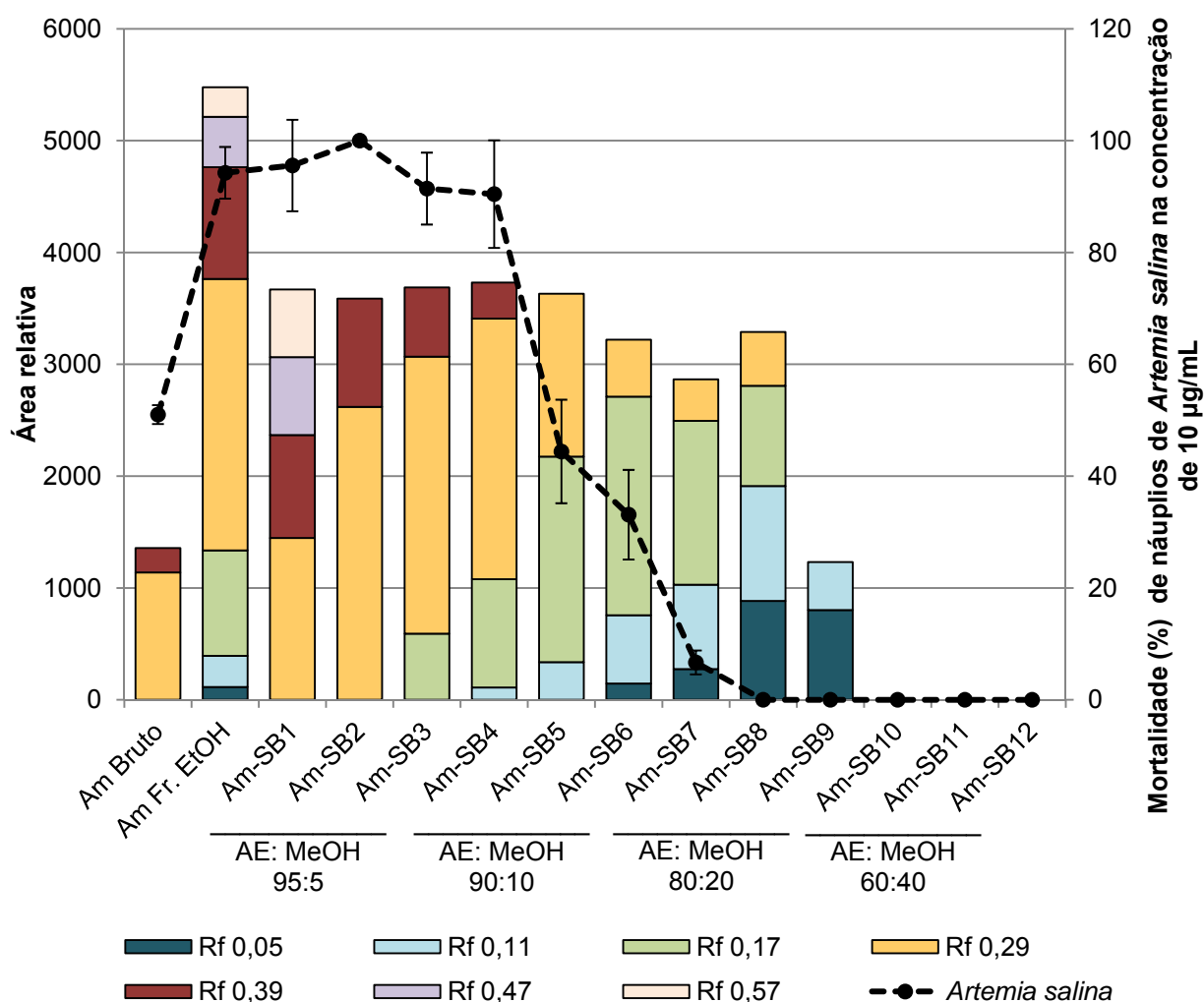


FIGURA 45 - HISTOGRAMA DAS ÁREAS DAS BANDAS DAS AMOSTRAS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL E SUBFRAÇÕES DE *Annona muricata*

Através do histograma apresentado acima, foi possível perceber que as duas bandas mais representativas que aparecem com alta intensidade no extrato bruto, fração etanol e nas subfrações com maior atividade em náuplios de *A. salina* são as que apresentam Rf de 0,29 e 0,39, indicando que são as acetogeninas com maior potencial ativo, aliás em pleno acordo com o que o revelado específico de Kedde semi-quantitativo para acetogeninas já havia antecipado. Também foi possível observar que apesar das subfrações Am-SB1 a 5 apresentaram conteúdos totais de acetogeninas semelhantes, estão presentes acetogeninas com menor efeito biológico, ou seja, as bandas com Rf 0,17 e 0,11 contribuem menos para a mortalidade de náuplios de *A. salina*.

Com base no grupo com que apresenta à maior bioatividade e também os maiores rendimentos do fracionamento, foram realizadas curvas dose-resposta das

subfrações Am-SB1 a Am-SB4 para náuplios de *A. salina* e os dados estão descritos na TABELA 8:

TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DAS SUBFRAÇÕES DA FRAÇÃO ETANOL DO EXTRATO BRUTO DE *Annona muricata* CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

	<b>Am-SB1</b>	<b>Am-SB2</b>	<b>Am-SB3</b>	<b>Am-SB4</b>
<b>CL<sub>2</sub></b>	0,02 (0,00 – 0,07)	0,09 (0,05 – 0,01)	0,01 (0,00 – 0,01)	0,05 (0,01 – 0,20)
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>0,48</b> <b>(0,17 – 1,36)</b>	<b>0,13</b> <b>(0,10 – 0,16)</b>	<b>0,59</b> <b>(0,43 – 0,82)</b>	<b>1,07</b> <b>(0,34 – 3,03)</b>
<b>CL<sub>99</sub></b>	18,02 (4,29 – 1060,13)	2,39 (1,45 – 4,80)	78,49 (39,35 – 193,65)	34,07 (8,29 – 3216,00)

NOTA: Concentrações letais (µg/mL) obtidas a partir de seis concentrações diferentes e n=40; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controle positivo = timol (92,54 µg/mL) com 100 % de mortalidade; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.

Dentre as quatro subfrações avaliadas, a que apresentou menor CL<sub>50</sub> foi a Am-SB2 com apenas 0,13 (0,10-0,16) µg/mL que apresenta um decréscimo neste parâmetro de 3,6 a 8,2 vezes em comparação com as demais e 4,8 vezes quando comparada a fração etanol, mostrando que o fracionamento levou a um enriquecimento na atividade letal frente *A. salina*.

Como a fração etanol e a sua subfração Am-SB2, que apresentaram as melhores atividades em náuplios de *A. salina*, foram realizadas curvas dose-resposta para larvas de *A. aegypti* e as concentrações letais estão descritas na TABELA 9, comparadas com o extrato bruto.

TABELA 9 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL E SUBFRAÇÃO Am-SB2 DE *Annona muricata* CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

	<b>Extrato bruto</b>	<b>Fração Etanol</b>	<b>Am – SB2</b>
<b>CL<sub>2</sub></b>	7,74 (2,43 - 14,88)	0,230 (0,06-0,50)	0,13 (0,00 – 0,45)
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>93,48</b> <b>(73,97 - 109,74)</b>	<b>3,58</b> <b>(2,14 – 5,93)</b>	<b>1,73</b> <b>(0,51 – 4,69)</b>
<b>CL<sub>99</sub></b>	1571,11 (914,32 - 4082,11)	80,03 (35,00-333,13)	33,46 (9,46 – 3094,38)

NOTA: Concentrações letais (µg/mL) obtidas a partir de seis concentrações diferentes com n=80 para cada uma; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controle positivo = 100 % de mortalidade; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.

Os dados encontrados para as mortalidades de larvas de *A. aegypti* mostram que houve um enriquecimento na atividade quando são realizados os fracionamentos em coluna de sílica gel. Comparando os valores de CL<sub>50</sub>, houve uma diminuição de 26 vezes no valor para a fração etanol quando comparado ao extrato

bruto e mesmo a subfração Am-SB2 apresenta uma decréscimo de duas vezes em relação à fração etanol-mãe. Estes dados demonstram que as bioatividades das frações e a amostra pAG correspondem a um maior conteúdo de acetogeninas, provando que atividade está diretamente relacionada com estas espécies químicas bem definidas.

Comparando o conteúdo de acetogeninas, expressos em valores das áreas relativas das bandas da cromatografia (ImageJ) realizada anteriormente com os valores de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) em larvas de *A. aegypti* foi obtida a FIGURA 46. Foi possível observar que o aumento no teor das acetogeninas com  $R_f$  0,39 e 0,29 está diretamente relacionado com os menores valores de  $CL_{50}$ , comprovando que são estas acetogeninas responsáveis pela atividade larvicida.

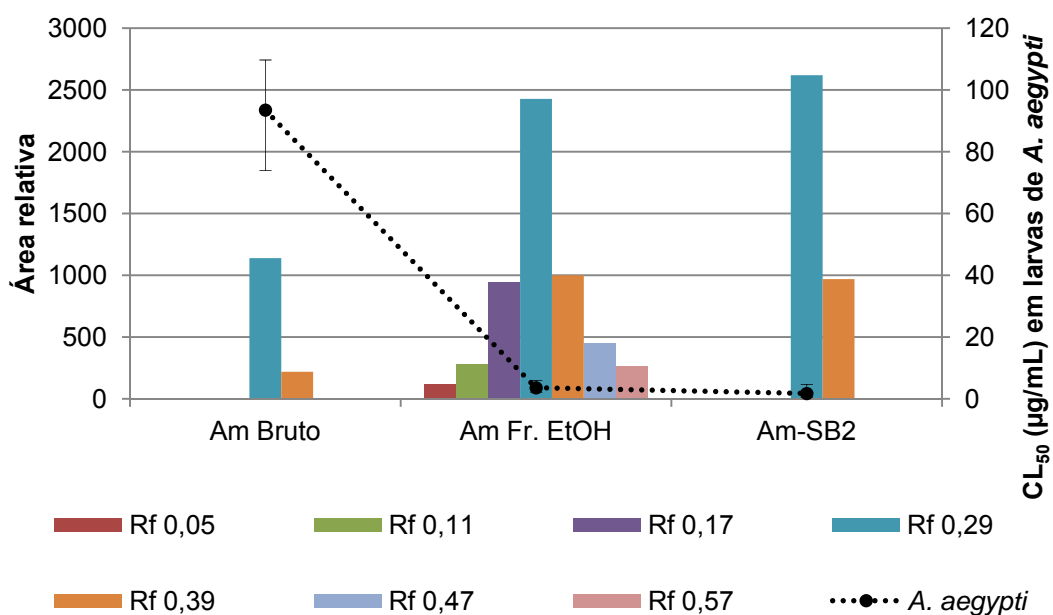


FIGURA 46 - CONTEÚDO DE ACETOGENINAS QUANTIFICADO POR DENSITOMETRIA RELACIONADO COM OS VALORES DE  $CL_{50}$  EM LARVAS DE *Aedes aegypti* DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL E Am-SB2 DE *Annona muricata*

Na FIGURA 47 estão ilustrados os aspectos morfológicos das larvas de *A. aegypti* controles negativos comparativamente às larvas expostas aos tratamentos com o extrato bruto, pAG (acetogeninas polares), fração etanol e subfração Am-SB2 e de *A. muricata*.



FIGURA 47 – LARVAS DE *Aedes aegypti* CONTROLES E TRATADAS COM O EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL, SUBFRAÇÃO Am-SB2 E ACETOGENINAS POLARES DE *Annona muricata*

NOTA: (1) Água; (2) Etanol; (3) Extrato etanólico bruto de *Annona muricata*; (4) pAG – amostra de acetogeninas polares.; (5) Fração etanol; (6) Am-SB2; n=10

FONTE: O autor (2010)

As larvas dos tratamentos com a fração etanol e subfração Am-SB2 seguem o aspecto das larvas tratadas com pAG e extrato bruto. As larvas tiveram aumento no tamanho total quando comparadas aos controles negativos chegando a 5,4 ( $\pm 0,61$ ) e 5,9 ( $\pm 0,68$ ) mm, respectivamente para fração etanol e Am-SB-2, como pode ser observado na TABELA 10. Assim, os valores do tamanho do abdômen aumentaram em torno de 17 e 27 %, assim como houve aparecimento muito evidente do cérvix.

TABELA 10 - MEDIDAS DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* CONTROLES E TRATADAS COM ACETOGENINAS POLARES, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL, SUBFRAÇÃO Am-SB2 DE *Annona muricata*

Amostras/ Medidas (%)	Cabeça	Cérvix	Tórax	Abdômen	Sifão
<b>Água</b>	15,62 ( $\pm 1,51$ ) a	0,00 ( $\pm 0,00$ ) a	12,55 ( $\pm 2,01$ ) a	58,04 ( $\pm 4,86$ ) a	12,94 ( $\pm 2,38$ ) a
<b>Etanol</b>	16,09 ( $\pm 1,17$ ) a	0,00 ( $\pm 0,00$ ) a	12,19 ( $\pm 2,18$ ) a	61,32 ( $\pm 8,68$ ) a,b	12,89 ( $\pm 3,54$ ) a
<b>pAG</b>	14,94 ( $\pm 1,54$ ) a	<b>3,04</b> <b>(<math>\pm 0,82</math>)</b> b	14,84 ( $\pm 1,54$ ) a	67,94 ( $\pm 10,65$ ) a,b	13,28 ( $\pm 1,00$ ) a
<b>Am Bruto</b>	13,99 ( $\pm 3,05$ ) a	<b>4,92</b> <b>(<math>\pm 1,70</math>)</b> a,b	15,93 ( $\pm 3,56$ ) a	77,50 ( $\pm 15,15$ ) a,b	14,24 ( $\pm 3,34$ ) a
<b>Am EtOH</b>	15,60 ( $\pm 2,73$ ) a	<b>5,03</b> <b>(<math>\pm 1,66</math>)</b> b	16,16 ( $\pm 2,06$ ) a	75,74 ( $\pm 8,17$ ) a,b	15,47 ( $\pm 2,70$ ) a
<b>Am-SB2</b>	17,22 ( $\pm 1,47$ ) a	<b>5,77</b> <b>(<math>\pm 1,09</math>)</b> b	18,37 ( $\pm 1,68$ ) a	<b>87,12</b> <b>(<math>\pm 11,35</math>)</b> b	14,14 ( $\pm 3,37$ ) a

NOTA: n=10 para cada grupo; os valores entre parêntesis representam o desvio-padrão; as medidas foram realizadas em porcentagem considerando o tamanho médio do grupo controle negativo (água e etanol) como 100 %; as letras representam diferença estatística determinada pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ); pAG – amostra de acetogeninas polares.



Os resultados acima descritos podem ser melhor visualizados na FIGURA 48, com diferença notável no tamanho do abdômen e surgimento do cérvice.

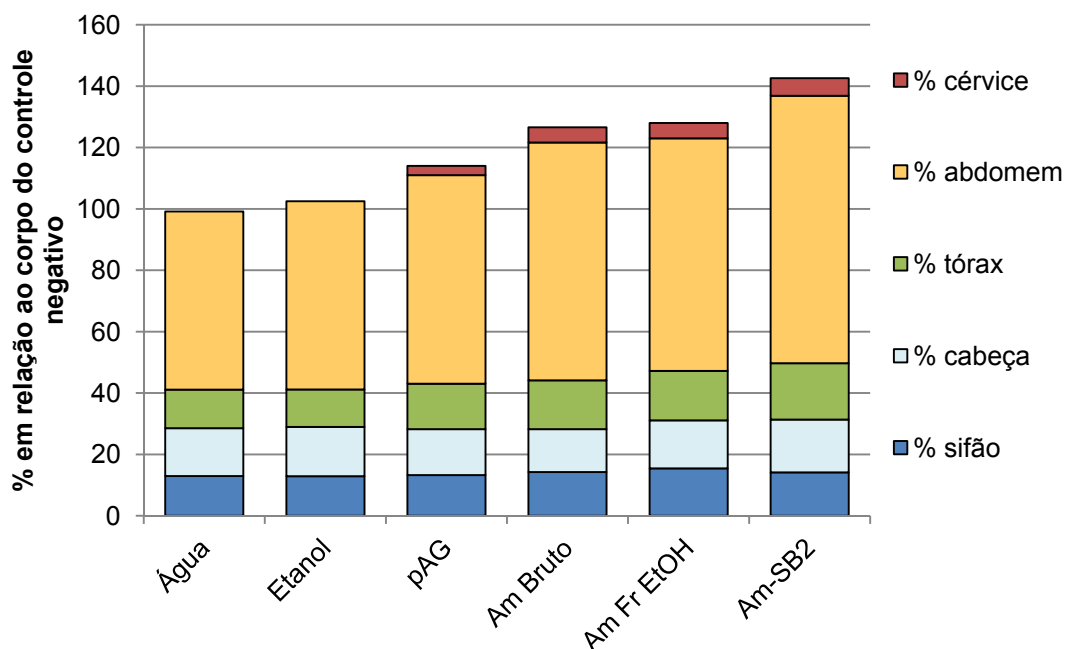


FIGURA 48 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM ACETOGENINAS POLARES, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ETANOL E Am-SB2 DE *Annona muricata*

### 5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS, CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DE *Piper nigrum*

#### 5.3.1 Extrato etanólico bruto de *Piper nigrum*

As concentrações letais do extrato etanólico bruto dos frutos de *P. nigrum* e do padrão de piperina para náuplios *A. salina* e larvas de *A. aegypti* larvas estão mostrados na TABELA 11 a seguir:

TABELA 11 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DOS DE *Piper nigrum* E DA PIPERINA PARA NÁUPLIOS DE *Artemia Salina* E LARVAS DE 3° INSTAR DE *Aedes aegypti*

	<i>Artemia salina</i>		<i>Aedes aegypti</i>	
	Extrato bruto	Piperina	Extrato bruto	Piperina
<b>CL<sub>2</sub></b>	0,35 (0,22 - 0,46)	0,73 (0,56 - 0,99)	0,96 (0,82 - 1,06)	1,09 (0,31 - 1,89)
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>2,78</b> <b>(2,31 - 3,61)</b>	<b>5,92</b> <b>(4,66 - 8,25)</b>	<b>1,84</b> <b>(1,76 - 1,95)</b>	<b>6,65</b> <b>(4,67 - 10,50)</b>
<b>CL<sub>99</sub></b>	29,37 (16,33 - 74,42)	63,62 (33,80 - 174,75)	3,86 (3,36 - 4,72)	51,77 (24,61 - 298,13)

NOTA: Concentrações letais (µg/mL) obtidas a partir de seis concentrações diferentes com n=40 para *Artemia salina* e n=80 para *Aedes aegypti*; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controles positivos = 100 % de mortalidade; controles negativos = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.

Para o extrato etanólico bruto dos frutos maduros de *P. nigrum*, o valor que encontramos CL<sub>50</sub> (µg/mL) foi de 1,84 (1,75-1,95). O extrato etanólico bruto dos frutos verdes de *P. nigrum* já havia sido avaliado contra larvas de 3° instar de *A. aegypti* resistentes ao piretróide cipermetrina e apresentou um valor de CL<sub>50</sub> de 0,98 µg/mL (SIMAS, 2007). Já para os extratos etanólicos de três outras espécies de Piperaceae avaliados contra larvas de 4° instar, as CL<sub>50</sub> encontradas foram maiores como segue: *P. longum* 2,23 (2,11-2,37); *P. ribesoides* 8,13 (7,84-8,42) e *P. sarmentosum* 4,06 (3,68-4,43) µg/mL (CHAITHONG, 2006).

A FIGURA 49 mostra o perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto de *P. nigrum*, comparado com os padrões de piperina e trioleína. A cromatoplaça A (esquerda) que foi visualizada em UV-365 nm após o *spray* de anisaldeído sulfúrico e se pode notar a forte presença de piperina com bandas verdes fluorescentes (Rf 0,60). Esta cor verde fluorescente também aparece na mancha menor com Rf 0,46 para o extrato bruto, possivelmente outra piperamida. Outros componentes com Rf superiores também são visíveis no extrato bruto, mas com cores fluorescentes diferentes, como laranja, azul e vermelho. Na placa B (direita), ou seja, após o aquecimento, as bandas violetas com altos Rfs de 0,95 e 0,87 são relacionados aos lipídios (TAGs, por exemplo). A piperina mantém-se como o principal componente apresentando uma cor verde-marrom (Rf 0,46).

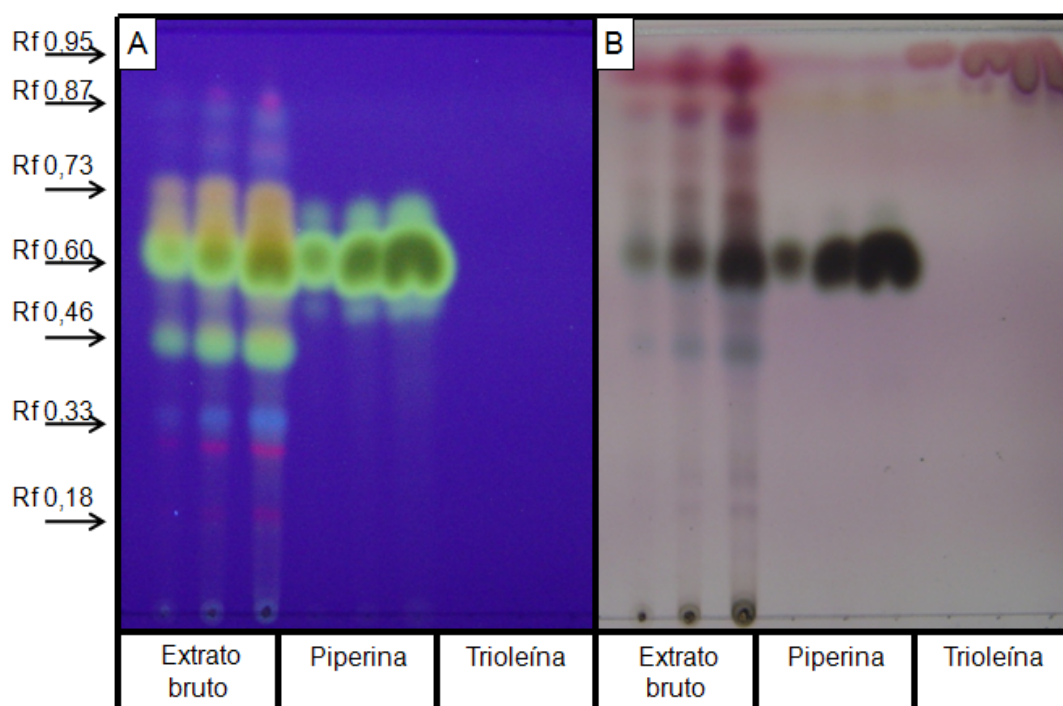


FIGURA 49 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Piper nigrum*, PIPERINA E TRIOLEÍNA

NOTA: Aplicações em volumes crescentes de 1, 10 e 20  $\mu\text{L}$  de soluções a 10 mg/mL; (A) Visualização em UV-365 nm após aplicação do *spray* de anisaldeído sulfúrico ; (B) Cromatoplaça após aquecimento

Com relação à atividade biológica do extrato bruto de *P. nigrum* e o padrão de piperina foi possível notar que o extrato bruto é muito heterogêneo, ou seja, a piperina, juntamente com outros componentes menores, é mais ativa do que a piperina avaliada isoladamente, 2,0 e 3,6 vezes para *A. salina* e *A. aegypti*, respectivamente. Assim, os componentes menores acima referidos, sobretudo o componente com Rf 0,46, os quais reagem do enfoque cromogênico de maneira semelhante à piperina nas duas placas, pode ser a explicação para este maior efeito biológico do extrato bruto. A literatura aponta vários outros compostos bioativos em *P. nigrum*, como por exemplo, as isobutilamidas que apresentaram  $\text{CL}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 0,039 para refractamida A, 0,1 para piperida, 0,89 para guineensina e 0,92 para pelitorina, considerando que a piperina também é uma amida, mas sem o substituinte isobutil apresentou  $\text{CL}_{50}$  de 5,1  $\mu\text{g/mL}$  neste trabalho (PARK, 2002).

O mecanismo de ação das piperamidas, como a piperina é exercido ao nível da enzima citocromo P450 causando neurotoxicidade ao inseto (FIGURA 50) (SCOTT, 2003; SCOTT, 2008). Também existe descrição na literatura que indica que o extrato de *P. nigrum* também atua na inibição da enzima acetilcolinesterase,

ou seja, mecanismo de ação semelhante aos organofosforados como o temefós (INGKANINAN, 2003).

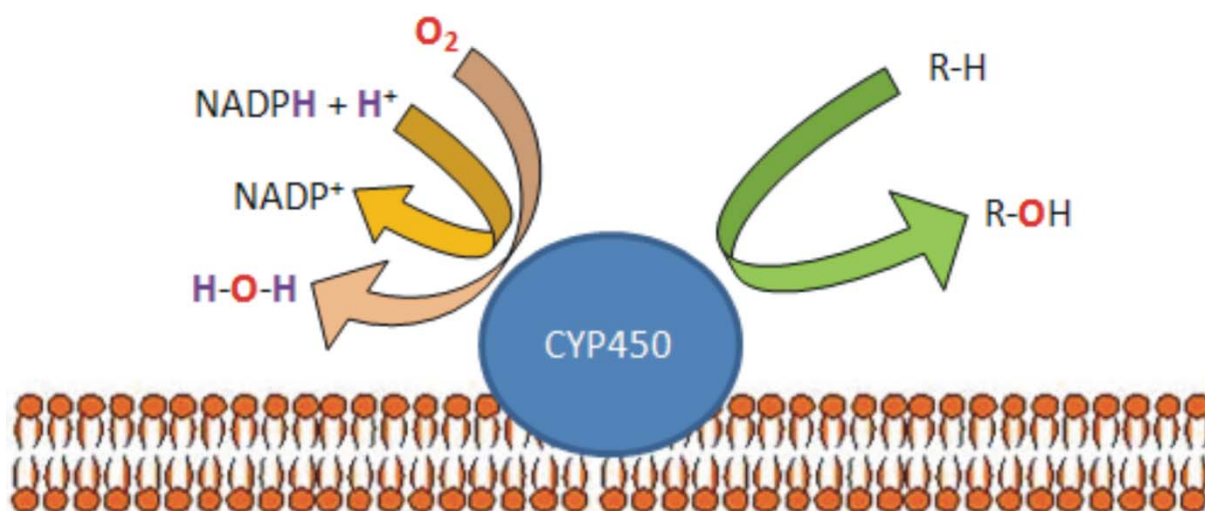


FIGURA 50 - ESQUEMA DO CITOCROMO P450

Na FIGURA 51 estão mostrados os aspectos controles positivos (água ou etanol), negativo (temefós) e das larvas de *A. aegypti* comparativamente àquelas expostas ao extrato etanólico bruto de *P. nigrum* e piperina.

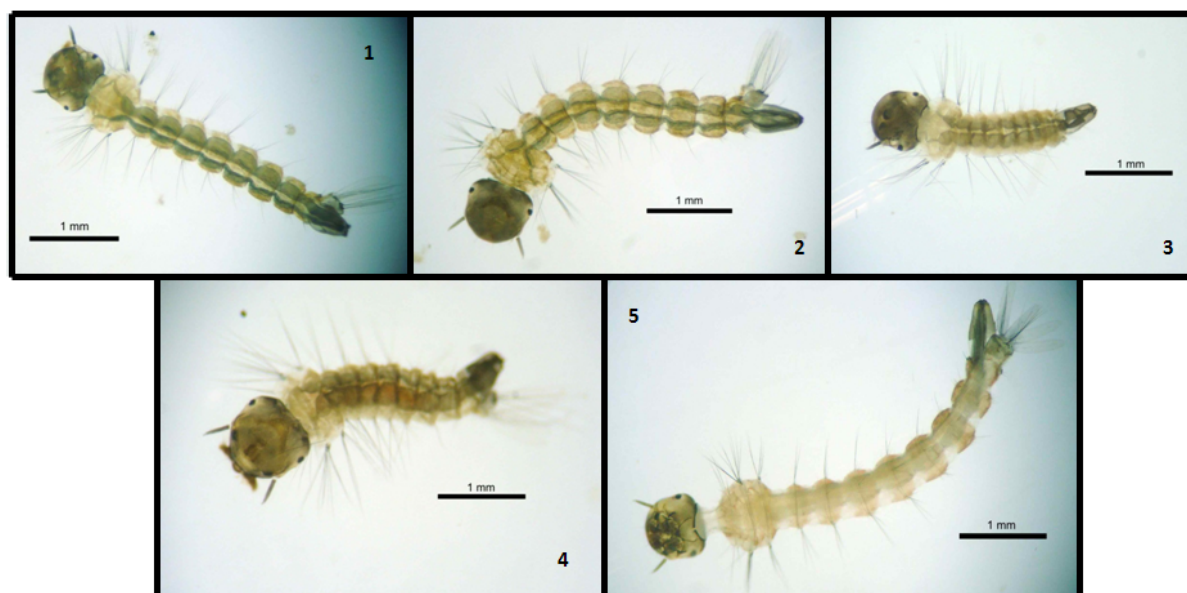


FIGURA 51 - LARVAS DE *A. aegypti* TRATADAS COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Piper nigrum*, PIPERINA E CONTROLES

NOTA: (1) Água; (2) Etanol; (3) Temefós; (4) Extrato etanólico bruto de *Piper nigrum* e (5) Piperina; n=10

FONTE: O autor (2010)

O aspecto das larvas expostas ao extrato etanólico bruto de *P. nigrum* é semelhante ao do controle positivo, temefós, com encurtamento no tamanho do corpo para 3,5 ( $\pm 0,70$ ) mm e diminuição de 12 % no tamanho do abdômen com relação às larvas dos controles negativos, apesar de não apresentar diferença estatística no teste de Tukey, conforme mostrado na TABELA 12. Já as larvas tratadas com o padrão de piperina com tamanho médio 3,7 ( $\pm 0,63$ ) mm, se apresentaram como um grupo heterogêneo, onde em cerca de 50 % houve o aparecimento do cérvice e outras apresentaram um encurtamento no abdômen.

TABELA 12 - MEDIDAS DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* TRATADAS COM O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Piper nigrum*, PIPERINA E CONTROLES

Amostras/ Medidas (%)	Cabeça	Cérvice	Tórax	Abdômen	Sifão
<b>Água</b>	15,62 ( $\pm 1,51$ ) a	0,00 ( $\pm 0,00$ ) a	12,55 ( $\pm 2,01$ ) a	58,04 ( $\pm 4,86$ ) a	12,94 ( $\pm 2,38$ ) a
<b>Etanol</b>	16,09 ( $\pm 1,17$ ) a	0,00 ( $\pm 0,00$ ) a	12,19 ( $\pm 2,18$ ) a	61,32 ( $\pm 8,68$ ) a	12,89 ( $\pm 3,54$ ) a
<b>Temefós</b>	16,57 ( $\pm 2,66$ ) a	0,00 ( $\pm 0,00$ ) a	11,31 ( $\pm 1,88$ ) a	40,07 ( $\pm 6,08$ ) a	10,23 ( $\pm 2,53$ ) a
<b>Piperina</b>	12,30 ( $\pm 1,55$ ) a	1,68 ( $\pm 1,51$ ) a	12,04 ( $\pm 2,23$ ) a	51,29 ( $\pm 10,55$ ) a	10,02 ( $\pm 2,53$ ) a
<b>Pn Bruto</b>	16,16 ( $\pm 4,22$ ) a	0,00 ( $\pm 0,00$ ) a	11,05 ( $\pm 2,42$ ) a	47,30 ( $\pm 11,97$ ) a	10,70 ( $\pm 3,53$ ) a

NOTA: n=10 para cada grupo; os valores entre parêntesis representam o desvio-padrão; as medidas foram realizadas em porcentagem considerando o tamanho médio do grupo controle negativo (água e etanol) como 100 %; as letras representam diferença estatística determinada pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

Os resultados expressos acima podem ser mais facilmente visualizados na FIGURA 52, onde apesar de não haver diferença estatística entre os diferentes grupos em nenhuma das partes medidas, é possível perceber que houve uma redução no tamanho do abdômen e consequentemente do corpo das larvas tratadas com temefós, piperina e extrato bruto de *P. nigrum*.

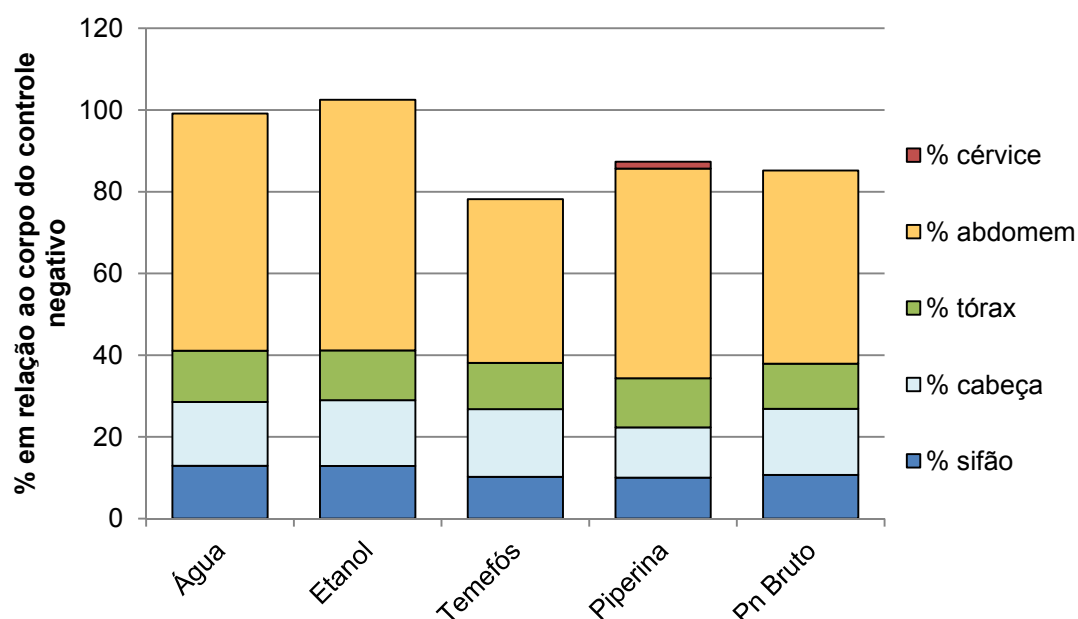


FIGURA 52 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM PIPERINA E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Piper nigrum*

### 5.3.2 Frações e subfrações do extrato etanólico bruto de *Piper nigrum*

Na TABELA 13 estão descritas as concentrações letais das frações do extrato bruto de *P. nigrum* para náuplios de *A. salina*:

TABELA 13 - CONCENTRAÇÕES LETAIS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DE *Piper nigrum* CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

	Hexano	Clorofórmio	Acetato de etila	Etanol	Metanol
<b>CL<sub>2</sub></b>	34,70 (31,34 - 37,54)	0,45 (0,33 - 0,55)	0,71 (0,55 - 0,73)	0,65 (0,35 - 0,92)	4,41 (3,36 - 5,19)
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>51,42</b> <b>(48,32 - 54,89)</b>	<b>1,85</b> <b>(1,68 - 2,08)</b>	<b>1,41</b> <b>(1,30 - 1,54)</b>	<b>4,73</b> <b>(3,95 - 6,12)</b>	<b>9,59</b> <b>(8,82 - 10,61)</b>
<b>CL<sub>99</sub></b>	80,28 (73,02 - 91,24)	9,23 (6,82 - 14,30)	3,09 (2,69 - 3,71)	45,03 (24,62 - 128,25)	23,06 (18,33 - 34,34)

NOTA: Concentrações letais (µg/mL) obtidas a partir de seis concentrações diferentes e n=40; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controle positivo = timol (92,54 µg/mL) com 100 % de mortalidade; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.

Na FIGURA 53 estão mostrados os perfis cromatográficos do extrato etanólico bruto de *P. nigrum* e suas frações:

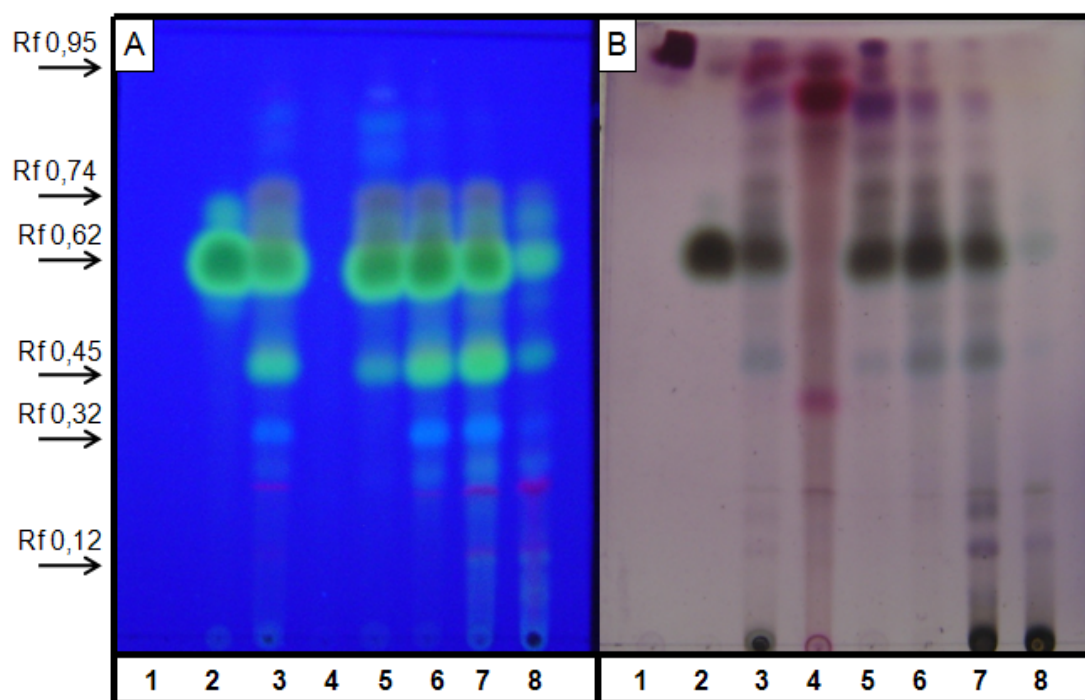


FIGURA 53 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Piper nigrum* E SUAS FRAÇÕES, TRIOLEÍNA E PIPERINA

NOTA: Aplicação de 10  $\mu$ L de amostra a 10 mg/mL; Visualização em UV-365 nm após aplicação do spray de anisaldeído sulfúrico ; (B) Cromatoplaça após aquecimento; (1) Trioleína; (2) Piperina; (3) Extrato bruto; (4) Fração hexano; (5) Fração clorofórmio; (6) Fração acetato de etila; (7) Fração etanol e (8) Fração metanol.

Na placa da esquerda (A), após o *spray* com anisaldeído sulfúrico, antes do aquecimento e visualização sob UV-365 nm, é possível visualizar a piperina como bandas amarelo-limão fluorescente ( $R_f$  0,62), acompanhada de outra mancha menor ( $R_f$  0,45) com igual padrão de revelação e possivelmente outra piperamida. Na amostra (3) – extrato bruto de *P. nigrum* – isto se repete além de outros 5 a 7 componentes, de concentrações muito menores também aparecerem mas seus padrões de fluorescência são completamente distintos desde o azul até o vermelho. Após o aquecimento da placa nebulizada com anisaldeído sulfúrico, o que intensifica proporcionalmente a detecção dos componentes antes mencionados, além da visualização da piperina (cinza-esverdeado), nota-se a presença de triacilgliceróis ( $R_f$  0,95) no extrato bruto, os quais se concentram na fração hexano e paulatinamente vão desaparecendo nas frações mais polares com hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol. A piperina do extrato bruto, contrariamente, se mostra ausente na fração hexano e se distribui mais ou menos equitativamente nas frações clorofórmio, acetato de etila e etanol, estando ausente



na mais polar, o metanol. A presença de piperina no extrato bruto e frações clorofórmio, acetato de etila e etanol (nestas 3 últimas já sob forma mais purificada), está diretamente relacionada com a atividade letal para náuplios de *A. salina*, sobretudo nas frações clorofórmio e acetato de etila, que apresentaram  $CL_{50}$  de 1,85 e 1,41  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Uma reinspeção da placa (B), harmonicamente, permite apreciar que o conteúdo relativo aparente e semelhante de piperina é o mesmo nas frações clorofórmio e acetato de etila e, portanto, algo menor no etanol. Mas, a fração etanólica é algo mais pobre nos contaminantes e a soma destes dois alegados se ajustam à diferença observada ( $1,81 - 1,45 =$ ), 0,44  $\mu\text{g/mL}$  e mais favorável à fração eluída com etanol no tocante à bioação letal sobre *A. salina*.

A partir das varreduras obtidas em espectrofotômetro do extrato etanólico bruto de *P. nigrum* e suas frações, conforme podemos visualizar na FIGURA 54 foi possível verificar que o comprimento de onda máximo exibido para todas as amostras foi em 343 nm, correspondente ao comprimento de onda máximo da própria piperina padrão

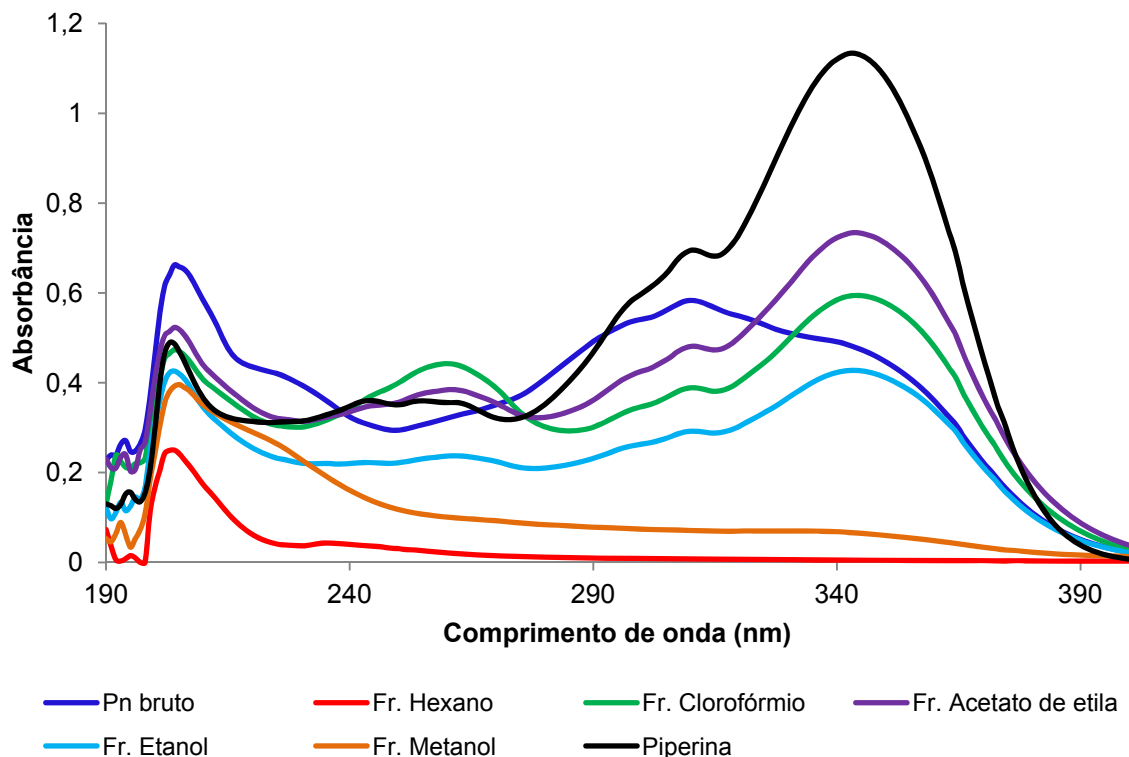


FIGURA 54 - ESPECTROS DE VARREDURA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. nigrum* E O PADRÃO DE PIPERINA

NOTA: Soluções de leitura no espectrofotômetro a 0,01 mg/mL em etanol.



Destarte foram obtidos os conteúdos de piperina em cada amostra em comparação com a curva padrão traçada a partir do padrão comercial (ANEXO 3). Com os dados do teor de piperina no extrato e suas frações derivadas foi confeccionada a FIGURA 55, que relaciona estes teores com as atividades em náuplios de *A. salina*.

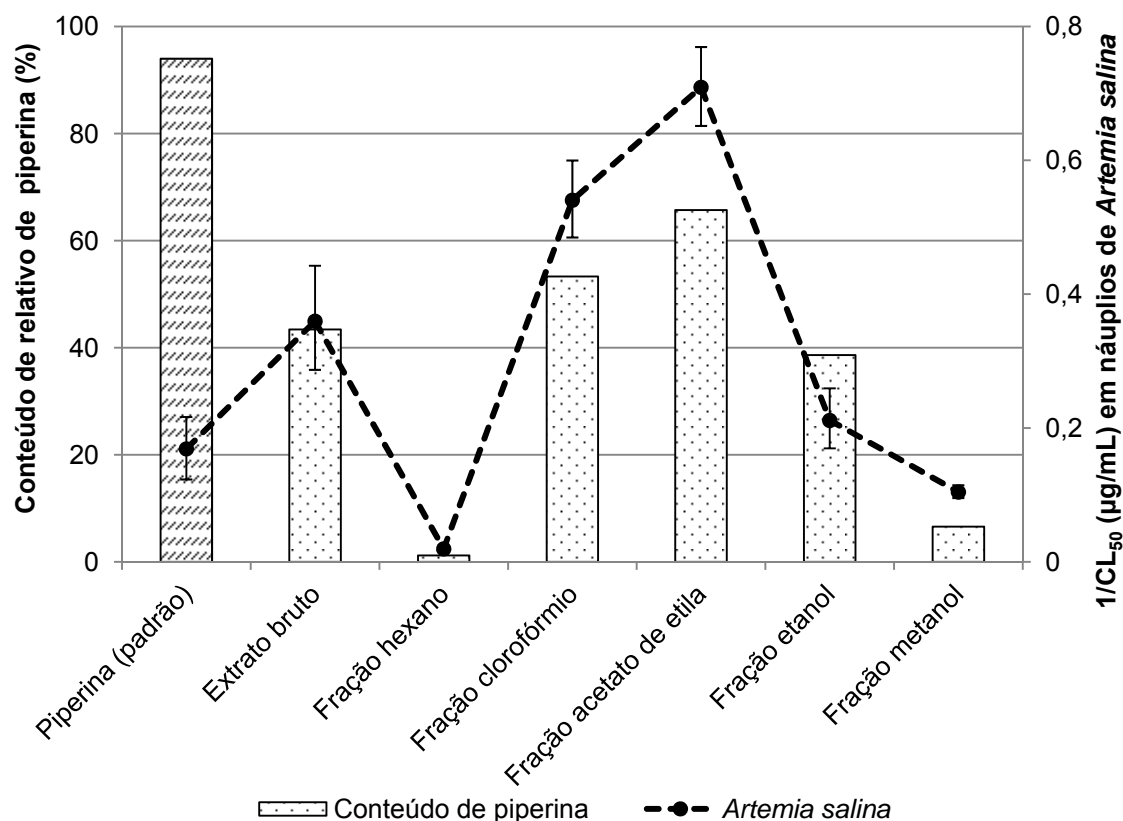


FIGURA 55 – RELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO RELATIVO DE PIPERINA E ATIVIDADE EM NÁUPLIOS DE *Artemia salina* DO EXTRATO ETANÓLICO E BRUTO E FRAÇÕES DE *Piper nigrum* E O PADRÃO DE PIPERINA

NOTA: Conteúdo relativo de piperina em % determinado em espectrofotômetro; Atividade em náuplios de *Artemia salina* expresso como 1/CL<sub>50</sub> (µg/mL); Soluções de leitura no espectrofotômetro a 0,01 mg/mL em etanol; as barras de erro para *Artemia salina* representam o intervalo de confiança (95%) determinado pelo método Probit com n=40

Relacionando o conteúdo de piperina e a atividade frente *A. salina*, se mostrou que existe uma forte correlação de Pearson de 0,946, indicando que a piperina e as outras piperimamidas relacionadas sejam responsáveis pela atividade frente aos náuplios.

Como a fração acetato de etila apresentou a maior bioatividade frente *A. salina* foi realizado, a partir dela, um subfracionamento que resultou em quinze

subfrações. Os resultados do rendimento e atividades deste fracionamento frente aos mesmos náuplios estão ilustrados na FIGURA 56:

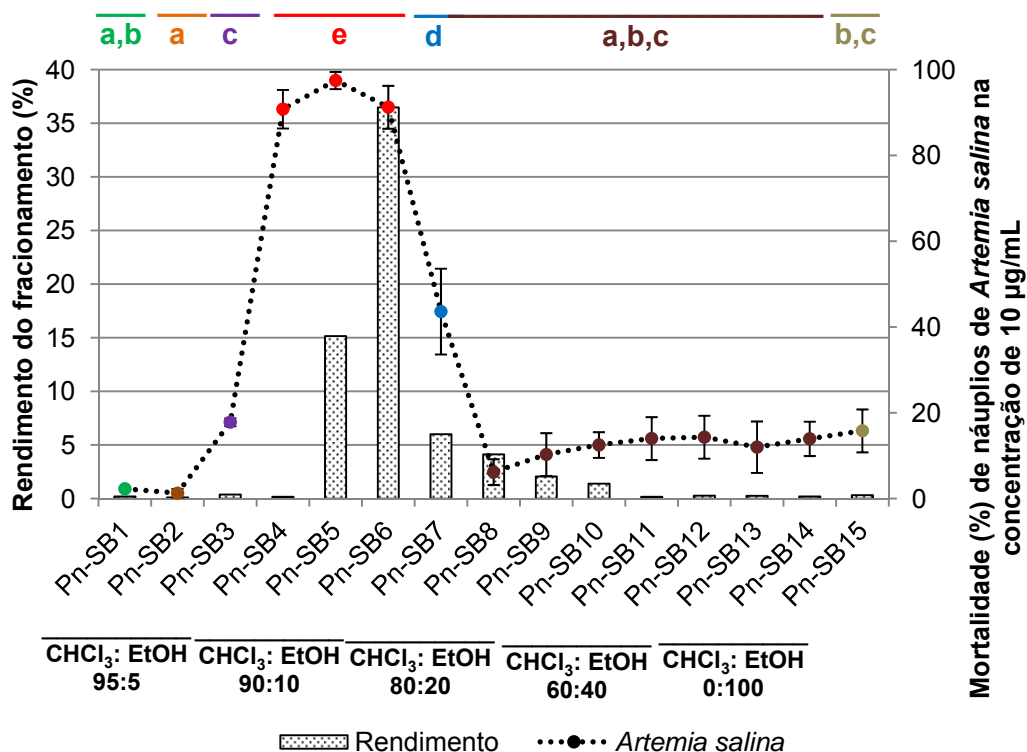


FIGURA 56 - RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO E ATIVIDADE EM NÁUPLIOS DE *Artemia salina* DAS SUBFRAÇÕES DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO BRUTO DE *Piper nigrum*

NOTA: n=120, as letras representam diferença estatística das mortalidades de *Artemia salina* determinada pelo Teste de Tukey com  $\alpha=0,05$ ; controle positivo = timol (92,54 µg/mL) com 100 % de mortalidade; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.

As subfrações que apresentaram os maiores rendimentos foram as Pn-SB5 a Pn-SB8 com valores de 15, 16, 36,5, 6,02 e 4,14 % respectivamente. Estas quatro frações representam 61,82 % da recuperação da coluna, sendo que para este fracionamento a recuperação total foi de apenas 67,42 %. Com relação às atividades frente aos náuplios de *A. salina*, as subfrações que apresentaram maiores atividades foram Pn-SB4 a Pn-SB6, correspondentes às maiores bandas de piperina e compostos relacionados ( $R_f$  0,62 e 0,72) conforme ilustrado na FIGURA 57 que mostra a cromatografia em camada delgada das subfrações de *P. nigrum*.

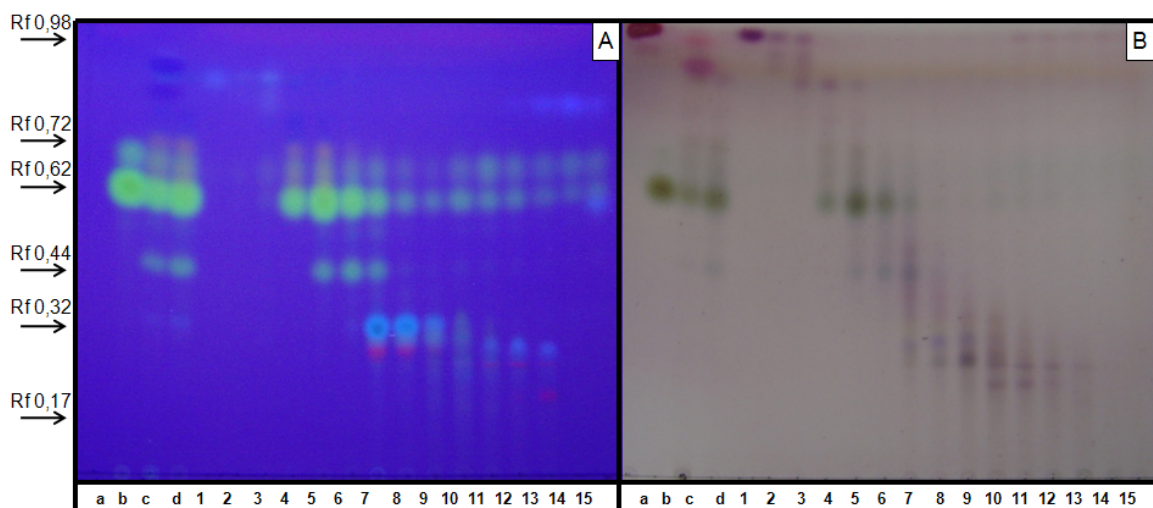


FIGURA 57 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS SUBFRAÇÕES DE *Piper nigrum*  
NOTA: (A) Placa visualizada em 365 nm após spray com anisaldeído; (B) Após aquecimento; (a) trioleína, (b) piperina, (c) extrato etanólico bruto de *P. nigrum*, (d) fração acetato de etila, (1-15) subfrações da fração acetato de etila. Volume de aplicação de 10 µL das soluções a 1 mg/mL:

Foram realizadas curvas dose-resposta das melhores subfrações para náuplios de *A. salina* e os dados estão descritos na TABELA 14.

TABELA 14 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DAS SUBFRAÇÕES DA FRAÇÃO ETANOL DO EXTRATO BRUTO DE *Piper nigrum* CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

	Pn-SB4	Pn-SB5	Pn-SB6
<b>CL<sub>2</sub></b>	0,49 (0,38 – 0,61)	0,83 (0,15 – 1,27)	2,14 (1,77 – 2,46)
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>2,24</b> <b>(1,96 – 2,57)</b>	<b>2,14</b> <b>(1,48 – 3,72)</b>	<b>4,80</b> <b>(4,44 – 5,18)</b>
<b>CL<sub>99</sub></b>	12,48 (9,74 – 17,10)	6,29 (3,66 – 67,55)	11,95 (10,23 – 14,83)

NOTA: Concentrações letais (µg/mL) obtidas a partir de seis concentrações diferentes e n=40; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controle positivo = timol (92,54 µg/mL) com 100 % de mortalidade; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.

Das três subfrações avaliadas, as duas primeiras, Pn-SB4 e Pn-SB5 apresentaram valores de CL<sub>50</sub> muito próximos de 2,24 (1,96-2,57) e 2,14 (1,48-3,72) µg/mL. Já a Pn-SB6 apresentou CL<sub>50</sub> de 4,80 (4,44-5,18) µg/mL, cerca de duas vezes maior que as outras subfrações.

Os dados do conteúdo de piperina relacionados com os valores de 1/CL<sub>50</sub> para náuplios de *A. salina* estão mostrados na FIGURA 58. As subfrações Pn-SB4 e Pn-SB5 que apresentaram as maiores atividades possuem teores de piperina diferentes, indicando que outros componentes são responsáveis pelo efeito de mortalidade do náuplios.

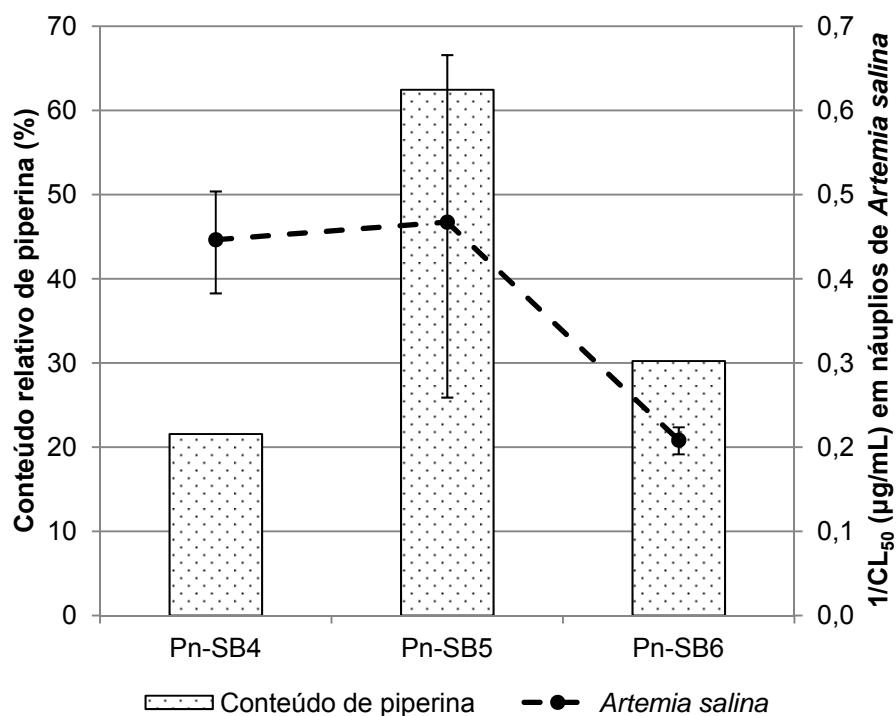


FIGURA 58 – RELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO DE PIPERINA E ATIVIDADE EM NÁUPLIOS DE *Artemia salina* DAS SUBFRAÇÕES DE *Piper nigrum*

NOTA: Soluções de leitura no espectrofotômetro a 0,01 mg/mL em etanol; as barras de erro para *Artemia salina* representam o intervalo de confiança (95%) determinado pelo método Probit com n=10

Como a fração acetato de etila e a subfração Pn-SB5 apresentaram as melhores atividades em náuplios de *A. salina*, foram realizadas, com as mesmas, curvas dose-resposta para larvas de *A. aegypti* e as resultantes concentrações letais estão descritas na TABELA 15:

TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES LETAIS DA PIPERINA, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E SUBFRAÇÃO Pn-SB5 DE *Piper nigrum* CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

	Piperina	Extrato bruto	Fração Acetato de etila	Pn-SB5
<b>CL<sub>2</sub></b>	1,09 (0,31 - 1,89)	0,96 (0,82 - 1,06)	1,05 (0,88-1,20)	0,52 (0,38 - 0,61)
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>6,65</b> <b>(4,67 - 10,50)</b>	<b>1,84</b> <b>(1,76 - 1,95)</b>	<b>2,13</b> <b>(1,98-2,29)</b>	<b>1,27</b> <b>(1,12 - 1,54)</b>
<b>CL<sub>99</sub></b>	51,77 (24,61 - 298,13)	3,86 (3,36 - 4,72)	4,69 (4,06-5,76)	3,49 (2,48 - 6,81)

NOTA: Concentrações letais (µg/mL) obtidas a partir de seis concentrações diferentes com n=80; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controle positivo = 100 % de mortalidade; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.

Os dados encontrados para as mortalidades de larvas de *A. aegypti* mostram que a fração acetato de etila apresenta valor de CL<sub>50</sub> (µg/mL) maior que o extrato bruto, confirmando que existe uma heterogeneidade de compostos presentes e

possivelmente ocorre um intra-sinergismo entre estes compostos na espécie *P. nigrum* e que estes compostos altamente bioativos, provavelmente estão presentes na Pn-SB5 que apresenta uma atividade melhorada quando comparado ao extrato bruto e sobretudo com o padrão de piperina.

Na FIGURA 59 estão mostrados os aspectos das larvas controle negativo (etanol) e daquelas tratadas com o extrato etanólico bruto de *P. nigrum*, padrão de piperina, fração acetato de etila e subfração Pn-SB5.

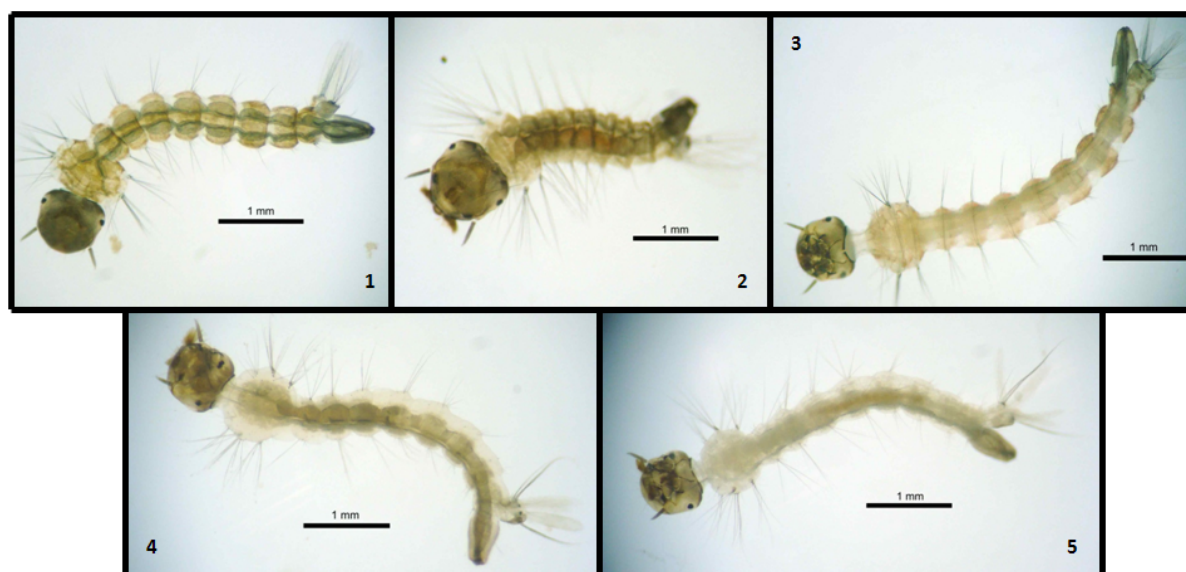


FIGURA 59 - LARVAS DE *Aedes aegypti* CONTROLES E TRATADAS COM O EXTRATO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, SUBFRAÇÃO Pn-SB5 DE *P. nigrum* E PIPERINA  
 NOTA: (1) Etanol; (2) Extrato etanólico bruto de *Piper nigrum*; (3) Piperina; (4) Fração acetato de etila e (5) Pn-SB5; n=10  
 FONTE: O autor (2010)

As larvas expostas à fração acetato de etila e a subfração Pn-SB5 apresentaram tamanho médio do corpo de 4,7 ( $\pm 0,44$ ) e 4,1 ( $\pm 0,73$ ) mm, respectivamente. Como o fracionamento levou a um enriquecimento no teor de piperina, quando comparado ao extrato bruto, as larvas apresentaram padrão morfológico semelhante à piperina, com a formação do cérvice. Porém, com relação ao tamanho do tórax houve um aumento discreto em torno de 5 e 2 % por ação da fração e sua subfração, comparativamente à dimensão observada com a piperina-padrão, conforme dados apresentados na TABELA 16:

TABELA 16 - MEDIDAS DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* CONTROLES E TRATADAS COM PIPERINA, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E Pn-SB5 DE *Piper nigrum*

Amostras/ Medidas (%)	Cabeça		Cérvice		Tórax		Abdômen		Sifão	
Água	15,62 (±1,51)	a	0,00 (±0,00)	a	12,55 (±2,01)	a,b	58,04 (±4,86)	a	12,94 (±2,38)	a
Etanol	16,09 (±1,17)	a	0,00 (±0,00)	a	12,19 (±2,18)	a,b	61,32 (±8,68)	a	12,89 (±3,54)	a
Piperina	12,30 (±1,55)	a	1,68 (±1,51)	a	12,04 (±2,23)	a	51,29 (±10,55)	a	10,02 (±2,53)	a
Pn Bruto	16,16 (±4,22)	a	0,00 (±0,00)	a	11,05 (±2,42)	a,b	47,30 (±11,97)	a	10,70 (±3,53)	a
Pn AE	17,11 (1,52)	a	0,99 (±1,70)	a	16,91 (±1,64)	b	64,45 (±6,85)	a	14,19 (±2,28)	a
Pn SB5	16,22 (±1,23)	a	1,50 (±1,46)	a	14,04 (±1,73)	a,b	60,23 (±13,33)	a	9,83 (±2,33)	a

NOTA: n=10 para cada grupo; os valores entre parêntesis representam o desvio-padrão; as medidas foram realizadas em porcentagem considerando o tamanho médio do grupo controle negativo (água e etanol) como 100 %; as letras representam diferença estatística determinada pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

Os dados apresentados anteriormente estão ilustrados na FIGURA 60, onde é possível perceber uma leve diminuição no tamanho das larvas tratadas com piperina e extrato bruto, porém na fração acetato de etila ocorreu efeito inverso. Estes dados apresentaram esta irregularidade possivelmente por conta da maior heterogeneidade composicional do extrato de frutos de *P. nigrum* e mesmo de suas frações e subfrações.

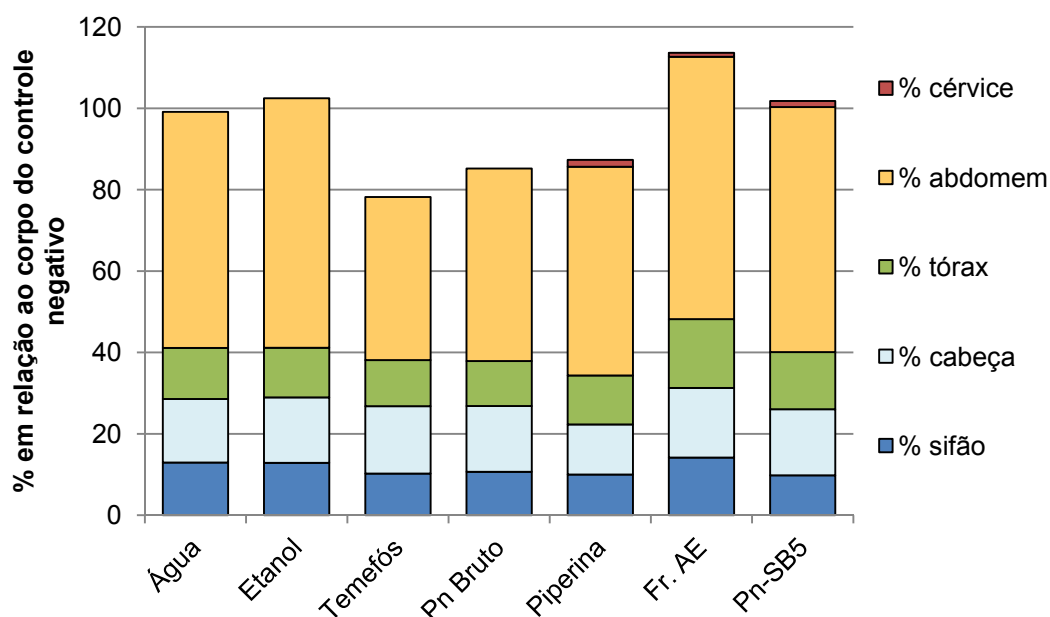


FIGURA 60 - DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM PIPERINA, EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E SUBFRAÇÃO Pn-SB5 DE *Piper nigrum*

#### 5.4 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DAS COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum*

Com base nos resultados globais das bioatividades dos extratos etanólicos brutos de *Annona muricata* (Am) e *Piper nigrum* (Pn) em náuplios de *A. salina* e larvas de *A. aegypti*, a combinação destes extratos podia resultar no aumento da mortalidade destes dois modelos biológicos e portanto, foram utilizadas duas metodologias estatísticas (teste de independência e concentração total/isobolograma) para avaliar a interação dos dois extratos brutos em combinação a partir dos dados experimentais.

##### 5.4.1 Combinação dos extratos contra *Artemia salina*

Os extratos brutos foram combinados em seis combinações variantes de Am e Pn. A proporção relativa de cada extrato, expressas em µg/mL em cada combinação, além das mortalidades esperadas e observadas nestas combinações para náuplios de *A. salina*, seus intervalos de confiança, bem como as diferenças de suas médias aritméticas e os resultados interpretados após a aplicação do teste de independência ( $\chi^2$ ) estão apresentados na TABELA 17.

TABELA 17 – COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona Muricata* E *Piper nigrum* AVALIADAS ATRAVÉS DO TESTE DE INDEPENDÊNCIA ( $\chi^2$ ) CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

Combinação/ Concentração µg/mL			Mortalidade (%)		$\chi^2$	$M_{OBS} - M_{ESP}$	Efeito
Am	Pn		$M_{ESP}$	$M_{OBS}$			
1	2,5	0,63	14,18 (0,39-30,09)	28,19 (12,05-44,33)	13,86	14,02	Sinergismo
2	2,5	1,25	28,92 (20,98-39,03)	50 (37,89 -62,11)	15,37	21,08	Sinergismo
3	2,5	2,5	73,07 (63,93-82,32)	95 (87,44-102,56)	6,58	21,93	Sinergismo
4	5	0,63	32,97 (17,49-46,84)	68,33 (59,16-77,51)	37,95	35,37	Sinergismo
5	5	1,25	44,48 (34,55-53,63)	74,43 (69,81-79,06)	20,17	29,95	Sinergismo
6	5	2,5	78,12 (78,97-86,55)	86,43 (80,58-92,28)	0,70	7,46	Aditividade

NOTA: n=80; efeito não-aditivo  $\chi^2 > 3,8415$ ,  $\alpha=0,05$ , GL=1

Das seis combinações larvicidas avaliadas, cinco apresentaram valores de  $\chi^2$  maiores que o valor tabelado, indicando que existe um efeito não-aditivo simples, ou seja, inexistência de mera soma aritmética de efeitos (sinergismo ou antagonismo) nas combinações 1 a 5, sendo que as combinações 4 e 5 apresentaram os maiores valores, na ordem de 38 e 20, respectivamente. Ademais, analisando os valores da diferença entre a mortalidade observada e esperada, todos os valores são positivos, indicando que existe sinergismo entre os extratos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum* em náuplios de *A. salina* nas combinações de 1 a 5.

Na FIGURA 61 estão mostrados os resultados das combinações dos extratos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum* em náuplios de *A. salina*. A partir de seis combinações realizadas em pares de concentrações, foram calculadas as mortalidades esperadas e comparadas com as mortalidades observadas através de teste *t*. Cinco combinações apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ), indicando uma interação positiva entre os dois extratos brutos, principalmente nas combinações 4 e 5 nas quais o aumento na mortalidade foi de 2 e 1,7 vezes, respectivamente.

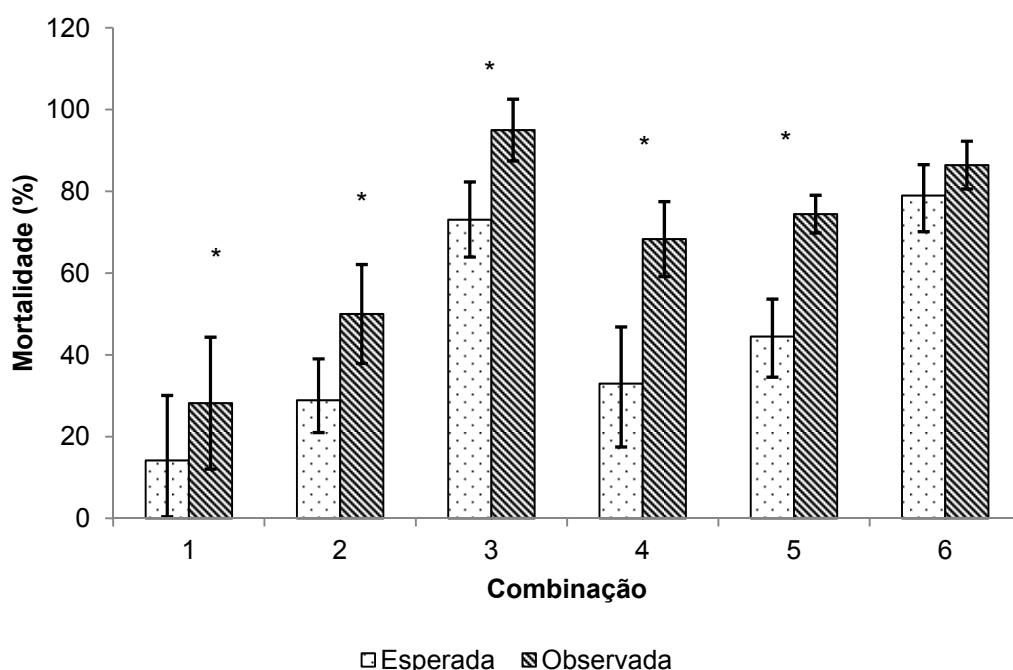


FIGURA 61 – MORTALIDADES ESPERADAS E OBSERVADAS DOS NÁUPLIOS DE *Artemia salina* ATRAVÉS DAS COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum*

NOTA: \* $p < 0,05$  (Teste *t* pareado),  $n=80$ ; as barras de erro representam o intervalo de confiança



Utilizando a metodologia do teste de independência foi observada a existência de sinergismo na maioria das combinações avaliadas, porém com o intuito de refinar melhor os resultados para verificar as melhores proporções e a tendência de sinergismo destas combinações nós utilizamos uma segunda metodologia (isoblograma/ concentração total), que utiliza combinações a partir das curvas dose-resposta para cada extrato avaliado individualmente. Os efeitos das combinações são aqui descritos em valores de CL<sub>50</sub>, que é o parâmetro mais utilizado para mensurar a atividade de drogas/extratos. Estas CL<sub>50</sub> (µg/mL) dos extratos etanólicos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum* avaliados individualmente e em diferentes combinações contra náuplios de *A. salina* estão mostradas na TABELA 18:

TABELA 18 - CL<sub>50</sub> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* AVALIADOS SEPARADAMENTE E EM DIFERENTES COMBINAÇÕES CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

Combinação (Am:Pn)	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	
	<i>Annona muricata</i>	<i>Piper nigrum</i>
Individual	10,2 (7,52-13,77)	2,78 (2,31-3,61)
A (10:90)	0,97 (0,57-1,31)	0,88 (0,51-1,18)
B (30:70)	3,46 (3,20-3,77)	0,81 (0,75-0,88)
C (50:50)	4,58 (4,34-4,88)	0,48 (0,43-0,49)
D (70:30)	7,43 (7,03-7,84)	0,32 (0,30-0,34)
E (90:10)	10,54 (9,54-11,62)	0,12 (0,11-0,13)

NOTA: n=80; valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança das CL<sub>50</sub> (µg/mL) com 95% de confiança estimado pelo método Probit.

Como pode ser observado, o extrato bruto de *P. nigrum* apresenta-se mais ativo para *A. salina* do que o extrato de *A. muricata*, apresentando uma relação (R) entre os valores de CL<sub>50</sub> (µg/mL) de 3,67 (3,26 - 3,81). Também é possível notar que todas as combinações avaliadas apresentaram CL<sub>50</sub> menores quando comparadas com as concentrações avaliadas individualmente.

A partir dos dados apresentados acima, foi construído um gráfico denominado isoblograma (FIGURA 62) que pode ser utilizado para mostrar onde os pares das concentrações de cada um dos extratos estão situados e indicar a existência dos efeitos entre eles. Das cinco combinações, três (A, B e C) apresentaram-se abaixo da linha de aditividade, ou seja, indicando a existência de efeitos sinérgicos entre os

extratos brutos de *A. muricata* e de *P. nigrum* contra náuplios de *A. salina*. Entretanto, as combinações D e E se situaram dentro do intervalo de confiança, indicando que existe um efeito apenas aditivo entre os dois extratos nestas duas particulares proporções de combinação.

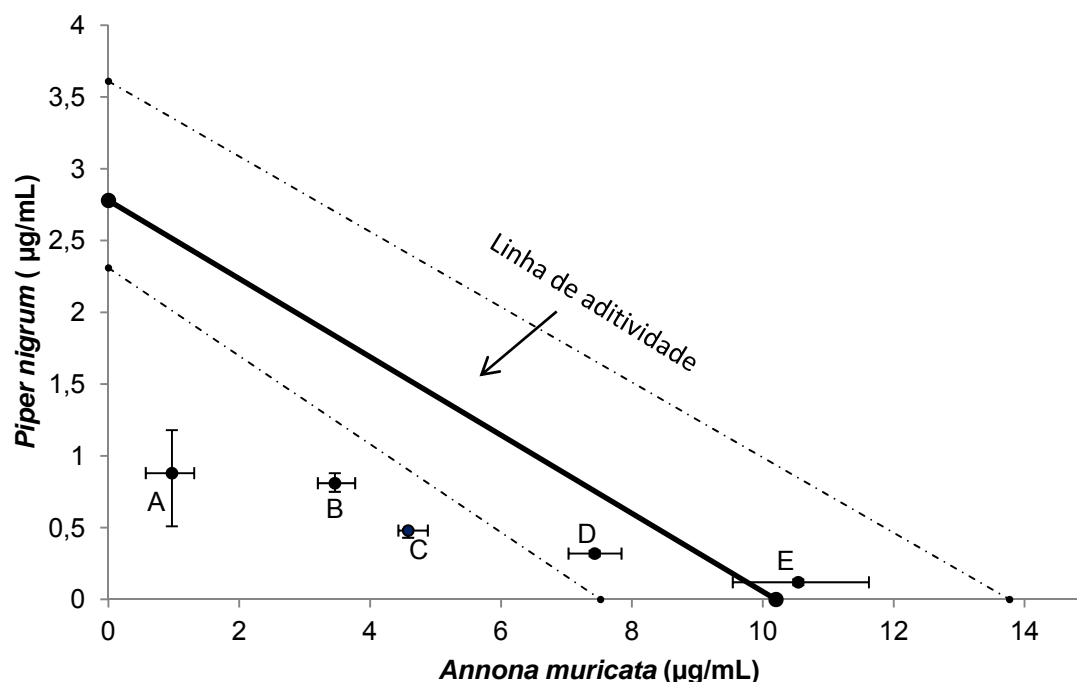


FIGURA 62 – ISOBOLOGRAMA DAS INTERAÇÕES LARVICIDAS EM *Artemia salina* ENTRE OS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* EM DIFERENTES PROPORÇÕES

NOTA: Proporções de Am:Pn (A=10:90; B=30:70; C=50:50; D=70:30; E=90:10); as barras de erro e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança com  $n=80$

Apesar de o gráfico isobolograma indicar quais são os efeitos que existem entre os dois extratos, é necessário aplicar os dados anteriormente apresentados nas equações, para determinar numericamente estes efeitos, bem como revelar a tendência de interação entre os extratos nas diferentes combinações. Portanto os valores numéricos de A e as concentrações totais ( $z_t$  e  $z_{add}$ ), bem como a relação entre estas concentrações totais estão descritos na TABELA 19.

TABELA 19 - VALORES NUMÉRICOS DE A E CONCENTRAÇÕES TOTAIS EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

Combinação (Am: Pn)	$p_1^{(a)}$	A	$z_t^{(b)}$	$z_{add}^{(b)}$	$R_z = z_{add}/z_t$
A (10:90)	0,1	0,41 (0,30-0,42)	1,23 (0,74-1,64)	3,00** (2,48-3,90)	2,43 (3,37-2,37)
B (30:70)	0,3	0,63 (0,52-0,75)	2,24 (2,19-2,40)	3,56* (2,92-4,64)	1,59 (1,33-1,93)
C (50:50)	0,5	0,62 (0,49-0,76)	2,72 (2,70-2,80)	4,37* (3,53-5,72)	1,61 (1,31-2,04)
D (70:30)	0,7	0,84 (0,66-1,06)	4,78 (4,78-4,95)	5,66 (4,49-7,47)	1,19 (0,94-1,51)
E (90:10)	0,9	1,08 (0,88-1,32)	8,67 (8,08-9,45)	8,05 (6,14-10,75)	0,93 (0,76-1,14)

NOTA: <sup>(a)</sup> proporção de *Annona muricata*; <sup>(b)</sup> concentração total em µg/mL; <sup>(\*)</sup>  $p < 0,1$  ou <sup>(\*\*)</sup>  $p < 0,05$  (teste  $t$  entre  $z_t$  e  $z_{add}$ )

Das cinco combinações avaliadas, quatro apresentaram valores numéricos de A abaixo de 1, indicando a existência de sinergismo ou superaditividade entre os dois extratos avaliados contra náuplios de *A. salina*, sendo que as combinações A, B e C foram as mais eficazes por apresentarem maior afastamento (0,41, 0,63 e 0,63) comparativamente à combinação D (0,84). Já a combinação E, com um valor próximo de 1,08, seria mais próxima de moderada aditividade e a depender do intervalo de confiança. As concentrações totais foram comparadas ( $z_t$  e  $z_{add}$ ) através de teste  $t$  pareado e as combinações A, B e C demonstraram diferença estatística, com valores de  $p < 0,1$ , sobretudo a combinação A, a qual apresentou diferença estatística com  $p < 0,05$ , comprovando, inequivocamente, que existe sinergismo entre os dois extratos e esta superaditividade vai diminuindo nas combinações à medida que também diminui a proporção de *A. muricata*.

Analisando as relações entre as concentrações totais de cada combinação, ou seja,  $R_z = z_{add}/z_t$ , isto é, quantas vezes a concentração total aditiva é maior que a concentração total encontrada, a combinação A apresenta um valor 2,43 vezes maior que o esperado, enquanto a combinação E, este valor foi menor do que o esperado (0,93). O aumento nestes valores ( $R_z$ ) está relacionado com a diminuição na proporção de *A. muricata*, indicando que para o modelo *A. salina*, quanto maior a proporção de *P. nigrum*, melhor é o sinergismo entre os dois extratos.

Esta correlação entre a proporção do extrato de *A. muricata* e as concentrações totais para náuplios de *A. salina* pode ser visualizada na FIGURA 63.

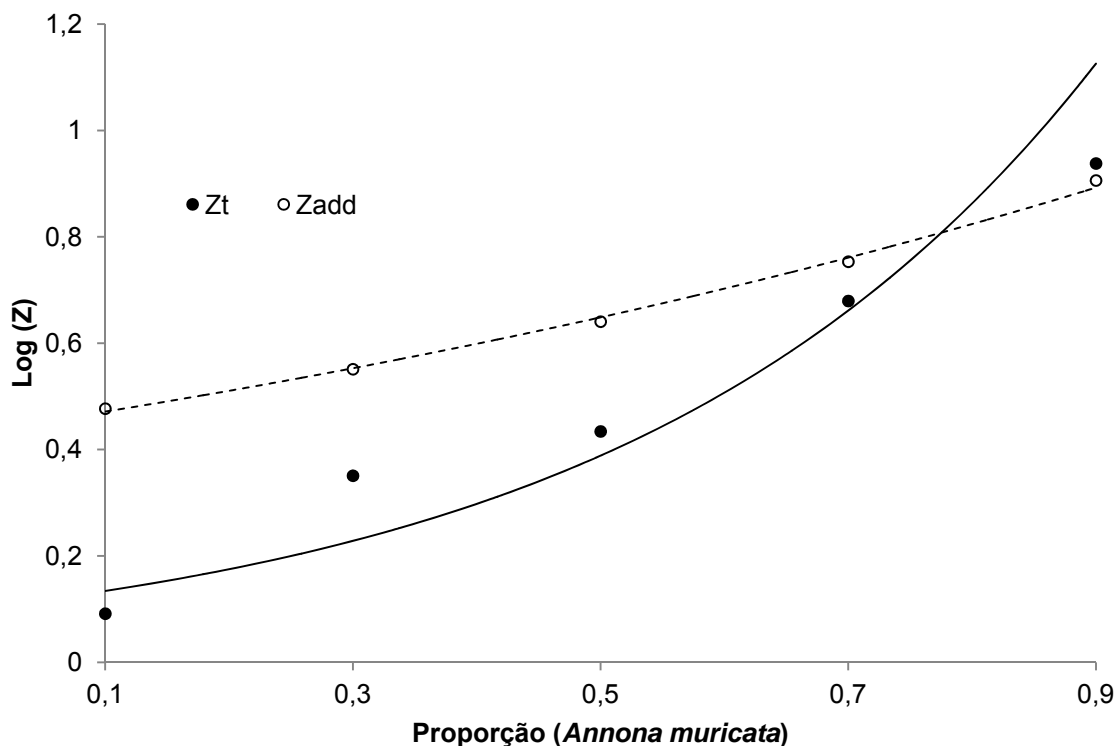


FIGURA 63 - LOG DA CONCENTRAÇÃO TOTAL *VERSUS* PROPORÇÃO DE *Annona muricata* EM DIFERENTES COMBINAÇÕES CONTRA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

O gráfico foi construído a partir do *log* da concentração total e a proporção de *A. muricata* nas diferentes combinações, onde foi possível comprovar a existência de uma interação positiva entre os dois extratos, nas combinações A, B e C, uma vez que as duas curvas não lineares de  $z_t$  e  $z_{add}$  são distantes uma da outra, e ainda, a curva de  $z_{add}$  está situada na porção superior da figura, demonstrando que existe sinergismo entre os dois extratos nestas três combinações. Entretanto, as combinações D e E apresentaram pontos mais próximos na curva, ocorrendo uma inversão na combinação E, tendendo a um antagonismo quanto maior a proporção de *A. muricata*. Portanto, para náuplios de *A. salina*, as combinações com maiores proporções de *P. nigrum* são mais efetivas.

#### 5.4.2 Combinação dos extratos contra larvas de *Aedes aegypti*

Também foram avaliadas combinações dos extratos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum* em diferentes concentrações através do teste de independência contra larvas de *A. aegypti*, e os resultados das mortalidades esperadas e observadas, bem como os valores de  $\chi^2$  e os efeitos observados estão mostrados na TABELA 20.

TABELA 20 - COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* AVALIADAS ATRAVÉS DO TESTE DE INDEPENDÊNCIA ( $\chi^2$ ) CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Combinação /		Mortalidade (%)		$\chi^2$	$M_{OBS} - M_{ESP}$	Efeito	
Concentração em µg/mL		$M_{ESP}$	$M_{OBS}$				
Am	Pn						
1	100	0,1	52,5 (51,5-53)	68,2 (63,65-72,75)	4,70	15,70	Sinergismo
2	62,5	0,75	37 (35,5-38,5)	76,68 (69,83-83,53)	42,55	39,68	Sinergismo
3	50	1	31,75 (29,44-34,86)	77,13 (70,81-83,45)	64,86	45,38	Sinergismo
4	37,5	1,25	30,25 (28,80-34,07)	74,62 (63,34-85,91)	65,09	44,37	Sinergismo
5	25	1,5	35,99 (35,03-37,71)	79,92 (68,21-91,64)	53,63	43,93	Sinergismo
6	75	1,5	57,82 (57,34-57,66)	96,28 (91,30-101,26)	25,58	38,46	Sinergismo

NOTA: n=80; efeito não-aditivo  $\chi^2 > 3,8415$ ,  $\alpha=0,05$ , GL=1

Analisando os dados do teste de independência, todas as combinações apresentaram efeito não-aditivo simples, pois apresentaram valores de  $\chi^2$  maiores que o tabelado, sobretudo as combinações 3 e 4 que apresentaram valores na ordem de 65 e além disso, a diferença entre os valores de mortalidade observada e esperada foram todos positivos confirmando que existe sinergismo entre os extratos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum* contra larvas de *A. aegypti*.

Adicionalmente, todas as seis combinações apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as mortalidades esperadas e observadas, indicando que existe sinergismo entre os compostos presentes nos dois extratos, principalmente nas combinações 3 e 4 nas quais houve um aumento na ordem de 2,4 vezes, conforme mostrado na FIGURA 64:

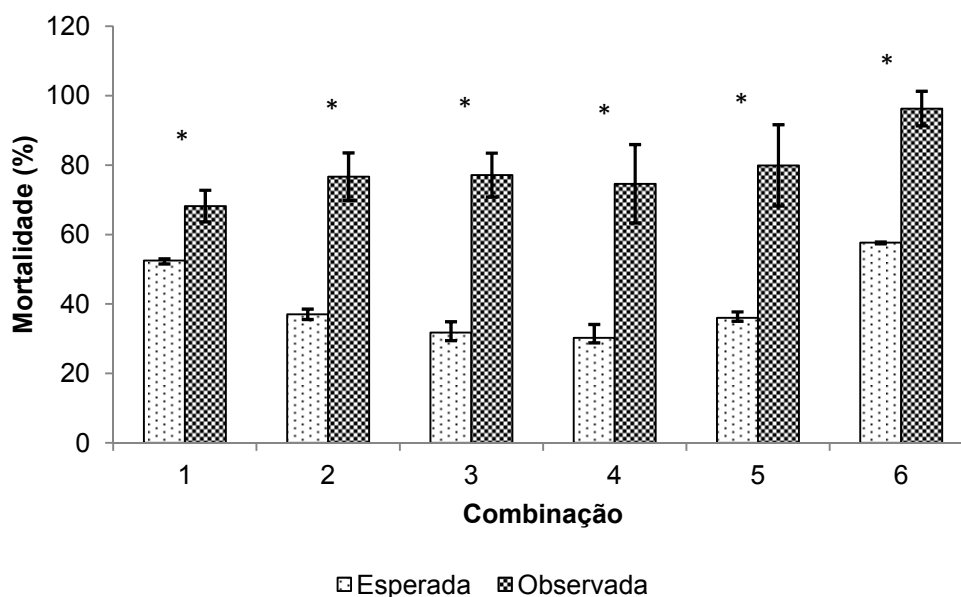


FIGURA 64 – MORTALIDADES ESPERADAS E OBSERVADAS DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* ATRAVÉS DAS COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum*

NOTA: \* $p < 0,05$  (Teste *t* pareado),  $n=80$ ; as barras de erro representam o intervalo de confiança

Assim, como para o modelo *A. salina*, as combinações dos extratos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum* mostraram positivo efeito sinérgico para larvas de *A. aegypti* e, portanto, também foi utilizada a segunda metodologia (isobolograma/concentração total) para avaliar quais as melhores combinações, bem como a tendência de interação dos dois extratos. Os efeitos também foram avaliados a partir do parâmetro de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) que estão descritos na TABELA 21:

TABELA 21 -  $CL_{50}$  DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* AVALIADOS SEPARADAMENTE E EM DIFERENTES COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA *Aedes aegypti*

Combinação (Am:Pn)	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>Annona muricata</i>	<i>Piper nigrum</i>
Individual	93,48 (73,97-109,74)	1,84 (1,75-1,95)
A (10:90)	3,31 (1,41-6,50)	1,08 (1,03-1,13)
B (30:70)	4,55 (0,69-11,60)	0,72 (0,67-0,76)
C (50:50)	8,43 (0,58-23,42)	0,52 (0,48-0,56)
D (70:30)	13,28 (2,07-31,95)	0,32 (0,11-0,43)
E (90:10)	13,19 (1,62-30,12)	0,10 (0,09-0,10)

NOTA:  $n=80$ ; valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança das  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) com 95% de confiança estimado pelo método Probit.

Como é possível observar, o extrato bruto de *P. nigrum* é mais ativo do que o de *A. muricata* para o modelo *A. aegypti* e esta relação (R) apresentou um valor mais elevado do que antes observado para *A. salina*, ou seja, 50,78 (42,37-56,23), contra apenas 3,67 (3,26 - 3,81), respectivamente. Os valores de CL<sub>50</sub> observados nas combinações também foram menores quando comparados aos extratos avaliados individualmente, e a partir do gráfico isoblograma (FIGURA 65), foi possível notar que os pares de todas as combinações estão situados bem abaixo da linha de aditividade, indicando que existe sinergismo inequívoco entre os dois extratos contra larvas de *A. aegypti*.

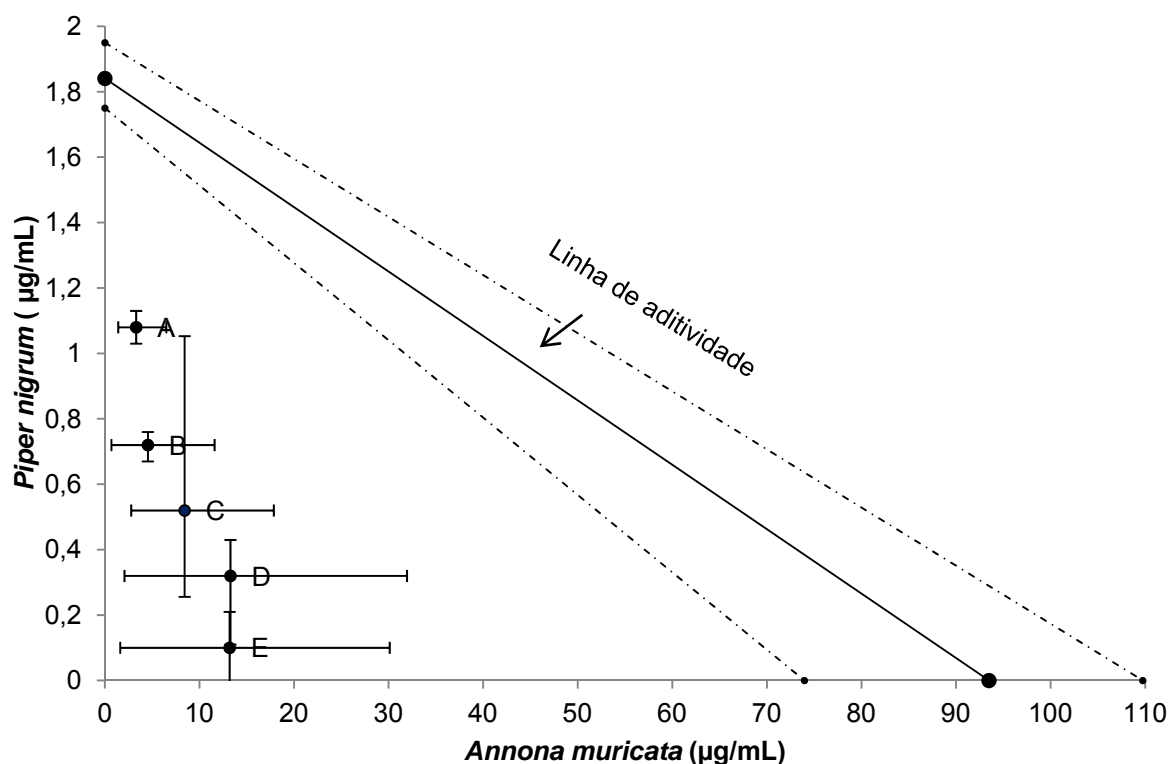


FIGURA 65 – ISOBOLOGRAMA DAS INTERAÇÕES LARVICIDAS EM *Aedes aegypti* ENTRE OS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* EM DIFERENTES PROPORÇÕES

NOTA: Proporções de Am:Pn (A=10:90; B=30:70; C=50:50; D=70:30; E=90:10); as barras de erro e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança com n=80

O isoblograma acima apresentado demonstrou que todas as combinações possuem sinergismo, porém, para avaliar numericamente os efeitos e a tendência de sinergismo, foram utilizadas equações que fornecem estes dados descritos na TABELA 22 expressos como valor numérico de A, concentrações totais ( $z_t$  e  $z_{add}$ ), relação destas concentrações, bem como as proporções das combinações.

TABELA 22 - VALORES NUMÉRICOS DE A E CONCENTRAÇÕES TOTAIS EM COMBINAÇÕES DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Combinação (Am: Pn)	$p_1^{(a)}$	A	$z_t^{(b)}$	$z_{add}^{(b)}$	$R_z = z_{add}/z_t$
A (10:90)	0,1	0,62 (0,61-0,64)	1,27 (1,18-1,38)	2,04 (1,93-2,16)**	1,61 (1,64-1,57)
B (30:70)	0,3	0,44 (0,39-0,50)	1,15 (0,97-1,37)	2,61 (2,47-2,77)**	2,27 (2,54-2,02)
C (50:50)	0,5	0,37 (0,28-0,50)	1,35 (0,96-1,92)	3,61 (3,41-3,84)**	2,68 (3,54-2,00)
D (70:30)	0,7	0,32 (0,09-0,51)	1,85 (0,50-3,19)	5,87 (5,52-6,25)*	3,17 (10,99-1,96)
<b>E (90:10)</b>	<b>0,9</b>	<b>0,20</b> <b>(0,07-0,33)</b>	3,06 (1,06-5,48)	15,64 (14,40-16,82)**	<b>5,12</b> <b>(13,61-3,07)</b>

NOTA: (a) proporção de *Annona muricata*; (b) concentração total ( $\mu\text{g/mL}$ ); (\*)  $p < 0,05$  ou (\*\*)  $p < 0,01$  (teste t entre  $z_t$  e  $z_{add}$ )

Todos os valores numéricos de A calculados apresentaram-se bem abaixo de 1, indicando a existência de sinergismo ou superaditividade entre os dois extratos avaliados contra larvas de *A. aegypti*. As concentrações totais foram comparadas ( $z_t$  e  $z_{add}$ ) através de teste t pareado e demonstraram diferença estatística, com valores de  $p < 0,05$ , em todas as combinações avaliadas, comprovando que existe sinergismo entre os dois extratos. Das cinco combinações, três apresentaram valores de  $p < 0,01$ .

Analisando as relações entre as concentrações totais de cada combinação, ou seja,  $R_z = z_{add}/z_t$ , isto é, quantas vezes a concentração total aditiva é maior que a concentração total encontrada, a combinação E apresenta um valor cinco vezes maior que o esperado, enquanto a combinação A, este valor é de apenas 1,61. O aumento nestes valores ( $R_z$ ) é diretamente proporcional ao aumento da proporção de *A. muricata*, enquanto os valores de A, são inversamente proporcionais, comprovando que quanto maior a proporção de *A. muricata*, melhor é o sinergismo entre os dois extratos, ou seja, exatamente ao contrário do que o anteriormente verificado em náuplios de *A. salina*.



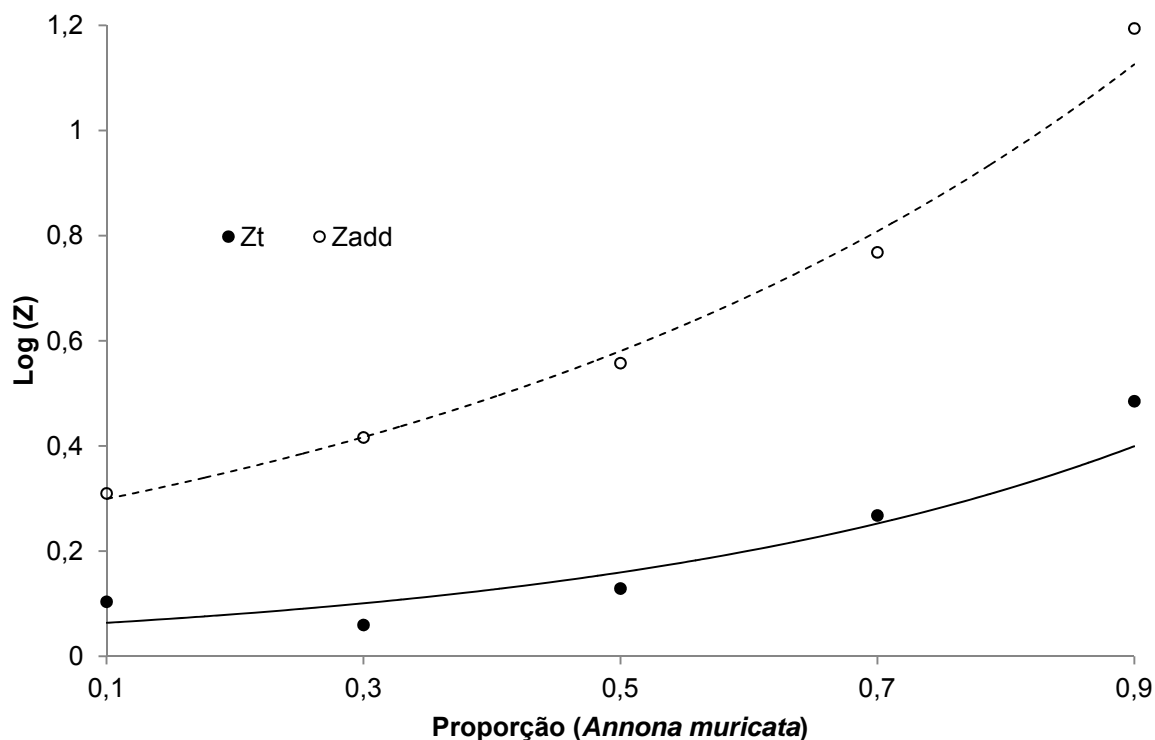


FIGURA 66 - LOG DA CONCENTRAÇÃO TOTAL VERSUS PROPORÇÃO DE *Annona muricata* EM DIFERENTES COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA *Aedes aegypti*

Na FIGURA 66, construída a partir do *log* da concentração total e a proporção de *A. muricata* nas combinações, é possível ver a existência de uma interação positiva entre os dois extratos, uma vez que as duas curvas não lineares de  $z_t$  e  $z_{add}$  são distantes uma da outra, e ainda, a curva de  $z_{add}$  está situada na porção superior da figura, demonstrando que existe sinergismo entre os dois extratos em quaisquer combinações avaliadas, com tendência a um efeito melhor quanto maior a proporção de *A. muricata* nas combinações.

Na FIGURA 67 estão apresentados os aspectos morfológicos das larvas tratadas com os extratos etanólicos brutos de *A. muricata* e *P. nigrum*, separadamente ou em diferentes combinações.

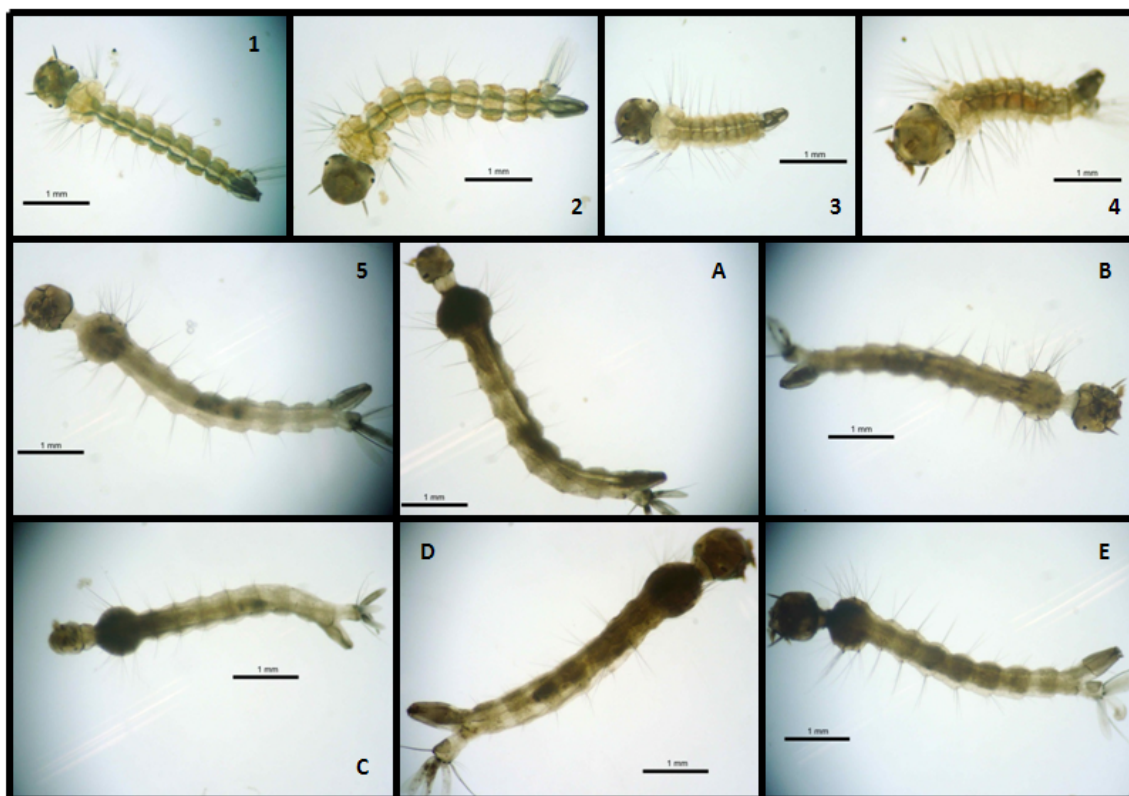


FIGURA 67 - LARVAS DE *Aedes aegypti* APÓS DIVERSOS TRATAMENTOS

NOTA: (1) Controle negativo com água; (2) Controle negativo com etanol; (3) Controle positivo com temefós; (4) Extrato bruto de *Piper nigrum*; (5) Extrato bruto de *Annona muricata*; (A-E) Diversas proporções entre extratos de *Annona muricata* e *Piper nigrum*; n=10  
 FONTE: O autor (2010)

Como já foram mostradas anteriormente, as larvas dos controles negativos (água e etanol) apresentaram o aspecto normal, com tamanho médio de 4,1 ( $\pm 0,36$ ) e 4,2 ( $\pm 0,85$ ) mm para água e etanol, respectivamente. Já as larvas expostas ao temefós e ao extrato bruto de *P. nigrum* apresentaram o abdômen encurtado com um tamanho médio de 3,4 ( $\pm 0,41$ ) e 3,5 ( $\pm 0,70$ ) mm, respectivamente. No caso das larvas expostas ao extrato bruto de *A. muricata*, o corpo se tornou alongado, com tamanho de 5,3 ( $\pm 1,05$ ) mm e o aparecimento de cérvix, assim como em quaisquer das combinações de *A. muricata* e *P. nigrum* que resultaram em perfil morfológico semelhante ao de *A. muricata* isoladamente e o tamanho médio das larvas nas combinações de A até E: 5,4 ( $\pm 0,58$ ); 5,2 ( $\pm 0,51$ ); 5,1 ( $\pm 0,40$ ); 5,4 ( $\pm 0,44$ ) e 5,2 ( $\pm 0,66$ ), sugerindo que o extrato bruto de *Annona* é o responsável por tais efeitos.

Os dados que comprovam a semelhança das combinações com o extrato bruto de *A. muricata* isoladamente estão descritos na TABELA 23, e mostram que houve um aumento no tamanho do abdômen em torno de 18 % em relação aos

controles negativos, ou seja, bem diferente do extrato bruto de *P. nigrum* que apresentou uma redução de 12 %. Isto também é claro com relação ao surgimento do cérvice por conta do mesmo extrato bruto de *A. muricata* e combinações com média 4,4 % de cérvice com relação ao tamanho total do corpo dos controles negativos.

TABELA 23 - MEDIDAS DAS LARVAS DE *Aedes aegypti* CONTROLES E TRATADAS COM OS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* SEPARADAMENTE E EM DIFERENTES COMBINAÇÕES

Amostras/ Medidas (%)	Cabeça	Cérvice	Tórax	Abdômen	Sifão
Água	15,62 (±1,51) a	0,00 (±0,00) a	12,55 (±2,01) a	58,04 (±4,86) a,b	12,94 (±2,38) a
Etanol	16,09 (±1,17) a	0,00 (±0,00) a	12,19 (±2,18) a	61,32 (±8,68) a,b	12,89 (±3,54) a
Temefós	16,57 (±2,66) a	0,00 (±0,00) a	11,31 (±1,88) a	40,07 (±6,08) a	10,23 (±2,53) a
Pn Bruto	16,16 (±4,22) a	0,00 (±0,00) a	11,05 (±2,42) a	47,30 (±11,97) a	10,70 (±3,53) a
Am Bruto	13,99 (±3,05) a	<b>4,92</b> <b>(±1,70)</b> b	15,93 (±3,56) a	<b>77,50</b> <b>(±15,15)</b> b	14,24 (±3,34) a
Comb. A	15,44 (±2,24) a	<b>3,54</b> <b>(±1,95)</b> b	16,82 (±2,32) a	<b>79,60</b> <b>(±7,10)</b> b	15,13 (±2,44) a
Comb. B	15,44 (±2,58) a	<b>4,85</b> <b>(±0,90)</b> b	16,51 (±1,30) a	<b>77,25</b> <b>(±6,65)</b> b	13,72 (±3,12) a
Comb. C	13,39 (±2,77) a	<b>4,16</b> <b>(±1,33)</b> b	16,54 (±1,95) a	<b>76,98</b> <b>(±5,68)</b> b	13,45 (±2,16) a
Comb. D	14,90 (±1,49) a	<b>4,50</b> <b>(±1,29)</b> b	16,57 (±2,09) a	<b>78,27</b> <b>(±6,82)</b> b	14,95 (±1,84) a
Comb. E	14,79 (±2,99) a	<b>4,40</b> <b>(±0,82)</b> b	15,88 (±1,67) a	<b>77,58</b> <b>(±7,64)</b> b	13,16 (±2,14) a

NOTA: n=10 para cada grupo; os valores entre parêntesis representam o desvio-padrão; as medidas foram realizadas em porcentagem considerando o tamanho médio do grupo controle negativo (água e etanol) como 100 %; as letras representam diferença estatística determinada pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

Os dados apresentados acima estão graficamente ilustrados, para mais fácil entendimento, na FIGURA 68 onde é possível perceber que entre sifão respiratório, cabeça e tórax não houve diferença significativa de tamanhos. Já no que concerne a abdômen está claramente evidenciado que houve redução ou aumento com relação aos controles negativos, bem como o surgimento de cérvice no extrato bruto de *A. muricata* e combinações.

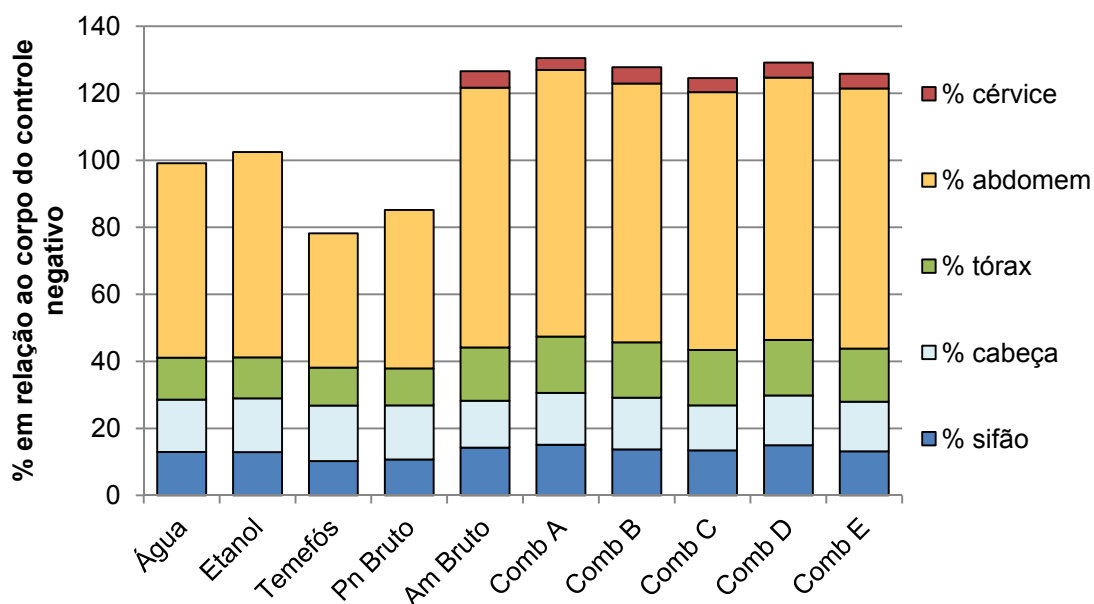


FIGURA 68 – DISTRIBUIÇÃO DAS MEDIDAS DAS LARVAS CONTROLES E TRATADAS COM OS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* SEPARADAMENTE E EM COMBINAÇÕES

Apesar de as medidas do tórax por conta da(s) bioatividade(s) do extrato bruto de *A. muricata* e combinações não apresentarem diferença estatística quando comparados em relação ao corpo inteiro, houve um pequeno aumento em torno de 4 % em relação aos controles negativos. Porém, quando fazemos a relação das medidas do tórax e cabeça, nota-se uma diferença estatística evidenciando este aumento, conforme pode ser observado na FIGURA 69:

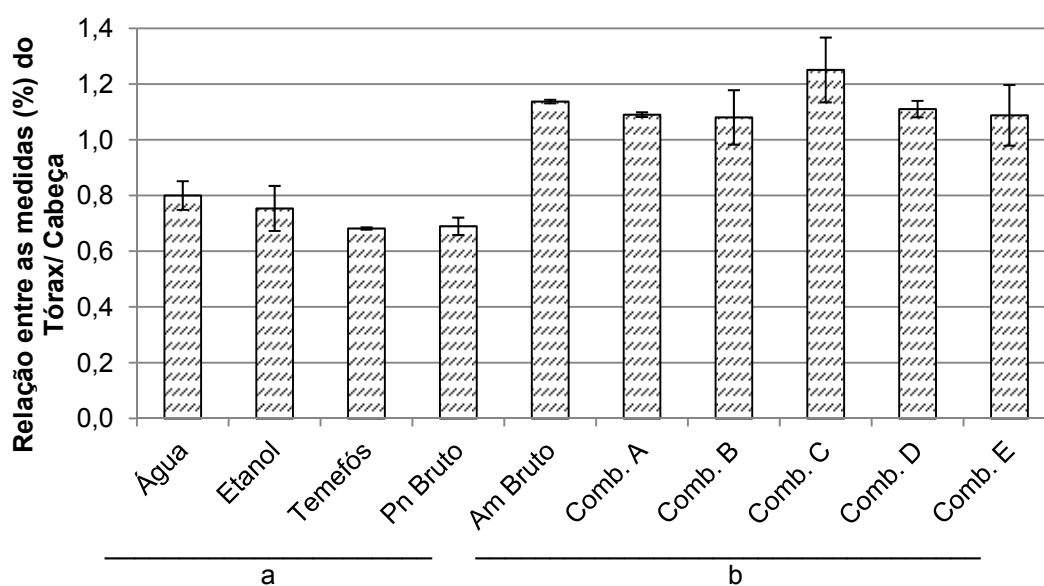


FIGURA 69 - RELAÇÃO DAS MEDIDAS TÓRAX PELA CABEÇA DAS DIFERENTES COMBINAÇÕES LARVICIDAS

NOTA: a e b se referem aos dois agrupamentos estatísticos definidos pelo teste de Tukey com  $n=10$

A TABELA 24 explicita a quantidade de cada extrato (em µg/mL ou mg/L) para assegurar a já referida CL<sub>99</sub> mas agora a partir dos nossos experimentos a partir de combinações sinérgicas dos dois extratos e também as DD ou Doses Diagnósticas, que correspondem exatamente ao dobro de cada CL<sub>99</sub>.

TABELA 24 – CL<sub>99</sub> E DOSES DIAGNÓSTICAS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DE *Annona muricata* E *Piper nigrum* INDIVIDUALMENTE E EM COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Proporção Am:Pn (%)	Quantidade de extrato/água			
	CL <sub>99</sub> (µg/mL ou mg/L)		DD (2xCL <sub>99</sub> ) (µg/mL ou mg/L)	
	Am	Pn	Am	Pn
<b>Am: Pn (0:100)</b>	-	3,86	-	7,72
<b>Am: Pn (10:90)</b>	27,33	1,70	54,66	3,4
<b>Am: Pn (30:70)</b>	88,30	1,42	176,6	2,84
<b>Am: Pn (50:50)</b>	258,64	1,31	517,28	2,62
<b>Am: Pn (70:30)</b>	424,53	0,88	849,06	1,76
<b>Am: Pn (90:10)</b>	573,29	0,17	1146,58	0,34
<b>Am: Pn (100:0)</b>	1571,11	-	3142,22	-

NOTA: DD = Dose Diagnóstica

Na TABELA 25 está demonstrada para fins mais práticos a quantidade, em gramas ou kilogramas, de sementes de *A. muricata* ou frutos maduros de *P. nigrum* necessárias para a obtenção dos extratos para cada litro ou tonelada de água. A fim de garantir a mortalidade praticamente total de larvas de *A. aegypti*, ou seja, as DD antes definidas como 2 x CL<sub>99</sub>. Há que se observar, obviamente, que em cada combinação de extratos, as quantidades relativas de cada um são, como desejável, sempre menores do que aquelas que, individualmente, produzem um mesmo efeito letal para *A. aegypti*, de forma que fique, inquestionavelmente, comprovado o efeito desejado nas combinações, o sinergismo ou superaditividade. Também está inserido nesta tabela, o fator de sinergismo, que relaciona a quantidade de planta necessária individualmente pela quantidade necessária em casa combinação. É possível notar que para a espécie *P. nigrum* os valores necessários de frutos desta planta variam de 2,27 até 22,71 vezes, ou seja, são quantidades menores que para a utilização do extrato individualmente. Já para a espécie *A. muricata*, este valor varia de 2,74 até 57,49, ou seja, é possível reduzir ainda mais as quantidades de planta nas combinações. Por exemplo, na combinação de 10% de graviola e 90% de pimenta com relação as curvas dose-resposta, são necessárias 268g de semente de graviola

e apenas 40 g de pimenta para produzir extrato para se utilizar em 1000 L de água. Vale ressaltar que para estes experimentos foram combinados os extratos brutos e que otimizando as condições de extração com a semi-purificação dos extratos, é possível reduzir ainda mais as quantidades necessárias de cada planta, fazendo com que a utilização dos extratos em combinação seja uma alternativa para o controle do vetor.

TABELA 25 - EXEMPLOS DE QUANTIDADES NECESSÁRIAS DAS ESPÉCIES BOTÂNICAS PARA A UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS INDIVIDUALMENTE E EM COMBINAÇÕES LARVICIDAS CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti* E O FATOR DE SINERGISMO RELACIONANDO AS DOSES INDIVIDUAIS E COMBINADAS

Proporção Am:Pn (%)	Quantidade de planta/água para DD g/L ou Kg/1000 L		Fator de sinergismo	
	Am	Pn	Am	Pn
<b>Am: Pn (0:100)</b>	-	0,090		
<b>Am: Pn (10:90)</b>	0,268	0,040	57,49	2,27
<b>Am: Pn (30:70)</b>	0,866	0,033	17,79	2,72
<b>Am: Pn (50:50)</b>	2,536	0,030	6,07	2,95
<b>Am: Pn (70:30)</b>	4,162	0,020	3,70	4,39
<b>Am: Pn (90:10)</b>	5,620	0,004	2,74	22,71
<b>Am: Pn (100:0)</b>	15,403	-		

NOTA: Os valores calculados das quantidades necessárias das espécies botânicas foram baseados nos rendimentos dos extratos em relação a 100 g de planta, ou seja, 20,4 g para Am e 8,06 g para Pn e nas doses diagnósticas; Fator de sinergismo calculado relacionando as quantidades necessárias individualmente e em combinações.

Em resumo, nossos resultados suportam a base inovativa do trabalho inicialmente proposto porque praticamente todas as combinações dos extratos etanólicos das sementes de *Annona muricata* e os frutos *Piper nigrum* exibem efeitos sinérgicos sobre a letalidade de náuplios de *A. salina* e principalmente em larvas de *Aedes aegypti*. Com base nos resultados apresentados nesta tese, sugere que para a espécie *P. nigrum*, onde o extrato bruto teve uma atividade superior às frações e que, portanto, possivelmente ocorre um intra-sinergismo entre os compostos presentes no extrato bruto, como a piperina e outras isobutilamidas. Ademais, como comprovado através dos métodos estatísticos, a combinação com a outra espécie, *A. muricata* apresenta-se como um inter-sinergismo.

Estes resultados podem ser explicados pela circunstância de que os principais componentes tóxicos destas duas plantas – acetogeninas e piperamidas – atuam segundo mecanismos de ação bioquímica completamente diferentes: as

acetogeninas de *Annona muricata* bloqueiam a geração de energia mitocondrial (ATP) e piperina/ amidas relacionadas de *Piper nigrum* causam efeitos neurotóxicos através da inibição enzimática do citocromo P450. Portanto, através do efeito sinérgico encontrado é possível reduzir as quantidades dos extratos necessários para produzir mortalidade das larvas de *A. aegypti*, vetor que persiste como um sério problema de saúde pública no País.

Estes resultados inéditos e positivos estão contemplados no depósito de um pedido de patente realizado junto ao INPI, no dia 07 de novembro de 2011 (ANEXO 4), intitulado “Composições fitopraguicidas sinérgicas a partir da combinação de extratos de Annonaceae e Piperaceae e processos de utilização contra *Aedes aegypti* e outras pragas”.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A escolha das plantas nativas ou exóticas encontradas no território brasileiro baseado em dados encontrados na literatura com potencial para ação larvicida ante o mosquito da dengue resultou em nove espécies botânicas;
- Os extratos etanólicos brutos obtidos das nove diferentes espécies tiveram rendimento de 7,3 a 21 g% (p/v) e os fracionamentos cromatográficos sobre sílica gel e gradientes progressivamente polares como fase móvel tiveram maiores rendimentos nas frações clorofórmio e acetato de etila para *Annona muricata* (graviola), *Melia azedarach* (cinamomo ou Santa. Bárbara) e *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), fração etanol para as espécies *Ilex paraguariensis* erva-mate), *Nicotiana tabacum* (fumo), *Origanum vulgare* (orégano), *Plumbago capensis* (bela Emília) e *Thymus vulgaris* (tomilho).
- Através do teste preliminar de letalidade para náuplios de *A. salina* foi possível classificar os extratos brutos e frações das espécies botânicas em três grupos: a) *Annona muricata* e sua fração etanol e *Piper nigrum* e suas frações frações clorofórmio, acetato de etila mostraram as mais altas atividades; b) *Melia azedarach* e suas frações clorofórmio e acetato de etila e *Origanum vulgare* e suas fração acetato de etila mostraram atividade intermediária; c) *Ilex paraguariensis*, *Nicotiana tabacum*, *Plumbago capensis*, *Tabebuia avellanedae* e *Thymus vulgaris* não foram considerados suficientemente ativos.
- O subfracionamento da fração etanol de *Annona muricata* resultou em quatro subfrações mais ativas (Am-SB1a Am-SB4) e o subfracionamento da fração acetato de etila de *Piper nigrum* resultou em três subfrações (Pn-SB4 a Pn-SB6).
- A caracterização dos extratos brutos e frações por espectrofotometria e cromatografia em camada delgada confirmou a presença de acetogeninas e piperina, que são compostos bioativos presentes nos extratos de *Annona muricata* e *Piper nigrum*, respectivamente.
- A bioatividade em larvas da espécie *Annona muricata* resultou em uma CL<sub>50</sub> em µg/mL de 93,48 para extrato etanólico bruto, 3,58 para a fração etanol e a 1,73 para a subfração Am-SB2, sendo que as larvas apresentaram aspecto morfológico de corpo alongado sobretudo no abdômen e cérvice (parte anterior ao tórax). Para a espécie *Piper nigrum* os valores de CL<sub>50</sub> foram de 1,84 para o



extrato bruto, 2,13 para a fração acetato de etila e 1,27 para a subfração Pn-SB5 e as larvas apresentaram um encurtamento no tamanho total do corpo, principalmente no abdômen.

- = A combinação dos extratos de *Annona muricata* e *Piper nigrum* mostraram efeito aditivo ou sinérgico para *A. salina*, com tendência de sinérgismo à medida que aumenta com o teor de extrato bruto de *P. nigrum*. Para as larvas de *A. aegypti* os efeitos foram todos sinérgicos e com tendência de aumento da potencialização dos efeitos com o aumento na proporção de *A. muricata*. Para as larvas de *A. aegypti*, todas as combinações apresentaram perfil morfológico semelhante ao extrato bruto de *A. muricata*, independente da proporção do extrato nas combinações, indicando a predominância da ação de acetogeninas sobre as piperamidas na determinação da alteração morfológica líquida, sendo que a melhor combinação foi de *A. muricata* (90 %) e *P. nigrum* (10 %) com a concentração total ( $Z_t$ ) encontrada 5 vezes maior que a concentração aditiva ( $Z_{add}$ ) esperada.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Isolamento de pelo menos três das principais acetogeninas polares de sementes de *Annona muricata* (graviola), determinação das respectivas CL<sub>50</sub> para larvas de *Aedes aegypti* e suas influências nas alterações morfológicas das larvas.
- Isolamento de pelo menos três das principais piperamidas de frutos maduros de *Piper nigrum* (pimenta-do-reino) e atendimento dos mesmos objetivos acima.
- Determinação dos tempos de meia-vida ( $T_{1/2}$ ) da acetogenina e da piperamida mais potente em curvas de temperatura na faixa de 15 a 35 °C e mediante a incidência ou não de luz em feixes equivalente à incidência solar média de verão.
- Avaliação da influência de excipientes (e.g., fotoprotetores; ácidos graxos poli-insaturados insaturados e anti-oxidantes) na formulação de combinações de acetogeninas e piperamidas.

## 8 REFERÊNCIAS

ALLEGRAUD, J., TOUBOUL, D., SCHMITZ-AFONSO, I., *et al.* **Structural study of acetogenins by tandem mass spectrometry under high and low collision energy.** Rapid Communications in Mass Spectrometry 24: 3602-3608, 2010.

ARAYA, H., SAHAI, M., SINGH, S., *et al.* **Squamocin-O<sub>1</sub> and squamocin-O<sub>2</sub>, new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*.** Phytochemistry 61(8): 999-1004, 2002.

ARCILA-LOZANO, C.C., LOARCA-PIÑA, G., LECONA-URIBE, S., *et al.* **El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición 54(1), 2004.

ASHIHARA, H., SANO, H. e CROZIER, A. **Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering.** Phytochemistry 69(4): 841-856, 2008.

BASTOS, D.H.M., FORNARI, A.C., QUEIROZ, Y.S., *et al.* **Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves.** Brazilian Archives of Biology and Technology 49(3): 399-404, 2006a.

BASTOS, D.H.M., ISHIMOTO, E.Y., MARQUES, M.O.M., *et al.* **Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions.** Journal of Food Composition and Analysis 19(6-7): 538-543, 2006b.

BENZ, G. **Synergism fo micro-organisms and chemical insecticides.** Microbial control of insects and mites. BURGESS, H.D.e HUSSEY, N.W. New York, Academic Press: 327-355, 1971.

BOBADILLA, M., ZAVALA, F., SISNIEGAS, M., *et al.* **Larvicidal evaluation of aqueous suspensions of *Annona muricata* Linnaeus (custard apple) against *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae).** Revista Peruana de Biología 12(1): 145-152, 2005.

BOURGUIGNON, S.C., CASTRO, H.C., SANTOS, D.O., *et al.* ***Trypanosoma cruzi*: in vitro activity of Epoxy-[alpha]-Lap, a derivative of [alpha]-lapachone, on trypomastigote and amastigote forms.** Experimental Parasitology 122(2): 91-96, 2009.

BRASIL. Acesso em 15/12/2008, disponível em <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/CULTURAS/2.2.A.XLS>.

BRASIL. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas.** Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. **Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela.** Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 1999.

BRASIL. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Informe Epidemiológico da Dengue - Janeiro a Novembro de 2008.** Acesso em 31/07/2009, disponível em [http://www.combatadengue.com.br/img/down/BOLETIM\\_15\\_jan\\_2009JaneiroNovembro.pdf](http://www.combatadengue.com.br/img/down/BOLETIM_15_jan_2009JaneiroNovembro.pdf).

BRAVO, L., GOYA, L. e LECUMBERRI, E. **LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages.** Food Research International 40(3): 393-405, 2007.

BUESO, C.E. **Soursop, Tamarind and Chironja.** Tropical and subtropical fruits: composition, properties and uses. SHAW, S.N.A.P.E. Westport, CT, AVI: 375-406, 1980.

BYEON, S.E., CHUNG, J.Y., LEE, Y.G., *et al.* **In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*.** Journal of Ethnopharmacology 119(1): 145-152, 2008.

CAMPA, C., DOULBEAU, S., DUSSERT, S., *et al.* **Diversity in bean caffeine content among wild *Coffea* species: evidence of a discontinuous distribution.** Food Chemistry 91(4): 633-637, 2005.

CARDOZO JR, E.L., FERRARESE-FILHO, O., CARDOZO FILHO, L., *et al.* **Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil.** Journal of Food Composition and Analysis(20): 553–558, 2007.

CARMEN ZAFRA-POLO, M., FIGADÈRE, B., GALLARDO, T., *et al.* **Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action.** Phytochemistry 48(7): 1087-1117, 1998.

CECOM. Acesso em 17/08/2011, disponível em <http://www.cecom.unicamp.br/dengue/mosquito.html>.

CHAITHONG, U., CHOOCHOTE, W., KAMSUK, K., *et al.* **Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera : Culicidae).** Journal of Vector Ecology 31(1): 138-144, 2006.

CHAMPY, P., HOGLINGER, G., FEEGER, J., *et al.* **Annonacin, the major acetogenin of *Annona muricata* (Annonaceae) induces neurodegeneration and astrogliosis in rats.** Movement Disord 17: S59-S60, 2002.

CHAMPY, P., MELOT, A., GUERINEAU, V., *et al.* **Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe.** Movement Disord 20(12): 1629-1633, 2005.

COELHO, G.C., RACHWAL, M.F.G., DEDECEK, R.A., *et al.* **Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Biochemical Systematics and Ecology 35(2): 75-80, 2007.

CONNOLLY, J.D. **Chemistry of the Limonoids of the Meliaceae and Cneraceae.** Chemistry and chemical taxonomy of the rutales. WATERMAN, P.G. e GRUNDON, M.F. London, Academic: 175, 1983.

CONSOLI, R. e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil.** Ed. Fiocruz, 1994.

CORIA, C., ALMIRON, W., VALLADARES, G., *et al.* **Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae).** Bioresource Technology 99(8): 3066-3070, 2008.

CRONQUIST, R.G.B. **The evolution and classification of flowering plants.** New York: New York Botanical Garden, 1988.

DE ANDRADE-NETO, V.F., GOULART, M.O.F., DA SILVA FILHO, J.F., *et al.* **Antimalarial activity of phenazines from lapachol, [beta]-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14(5): 1145-1149, 2004.

DE PAIVA, S.R., FONTOURA, L.D., FIGUEIREDO, M.R., *et al.* **Chromatographic profile of two plumbaginaceae species: *Plumbago scandens* L. and *Plumbago auriculata* LAM.** Química Nova 25(5): 717-721, 2002.

DENG, W.-W., LI, Y., OGITA, S., *et al.* **Fine control of caffeine biosynthesis in tissue cultures of *Camellia sinensis*.** Phytochemistry Letters 1(4): 195-198, 2008.

DOCAMPO, R., CRUZ, F.S., BOVERIS, A., *et al.* **[beta]-lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by Sarcoma 180 ascites tumor cells.** Biochemical Pharmacology 28(6): 723-728, 1979.

DOCAMPO, R., LOPES, J.N., CRUZ, F.S., *et al.* ***Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by [beta]-lapachone.** Experimental Parasitology 42(1): 142-149, 1977.

DOS SANTOS, A.F. e SANT'ANA, A.E.G. **Molluscicidal properties of some species of *Annona*.** Phytomedicine 8(2): 115-120, 2001.

DUFRESNE, C. e FARNWORTH, E. **Tea, Kombucha, and health: a review.** Food Research International 33(6): 409-421, 2000.

FARENHORST, M., KNOLS, B.G.J., THOMAS, M.B., *et al.* **Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes.** PLoS ONE 5(8): e12081, 2010.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis.** New Delhi: Ed. S. Chand & Company Ltda, 1981.

FIOCRUZ. **Dengue.** Acesso em 14/04/2011, disponível em <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/>

FIOCRUZ. **Dengue 4: IOC detecta primeiros casos no RJ.** Acesso em 14/04/2011, disponível em <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1122&sid=32>.

FONTANA, J.D., LANCAS, F.M., PASSOS, M., *et al.* **Selective polarity- and adsorption-guided extraction purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests.** Applied Biochemistry and Biotechnology 70-2: 67-76, 1998.

GILLIJ, Y.G., GLEISER, R.M. e ZYGADLO, J.A. **Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina.** Bioresource Technology 99(7): 2507-2515, 2008.

GIULIAN, R., DOS SANTOS, C.E.I., SHUBEITA, S.D., *et al.* **Elemental characterization of commercial mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) before and after hot water infusion using ion beam techniques.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(3): 741-746, 2007.

GLEYE, C., LAURENS, A., HOCQUEMILLER, R., *et al.* **Isolation of montecristin, a key metabolite in biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and its structure elucidation by using tandem mass spectrometry.** Journal of Organic Chemistry 62(3): 510-513, 1997.

GONÇALVES, A.M., VASCONCELLOS, M.E., DOCAMPO, R., *et al.* **Evaluation of the toxicity of 3-allyl-[beta]-lapachone against *Trypanosma cruzi* bloodstream forms.** Molecular and Biochemical Parasitology 1(3): 167-176, 1980.

GU, Z.-M., ZHAO, G.-S., OBERLIES, N.H., *et al.* **Annonaceous acetogenins - potent mitochondrial inhibitors with diverse applications.** Phytochemistry of Medicinal Plants. AL., J.T.A.E. New York, Plenum Press: 249-310, 1995.

GUIRADO, M.M. e BICUDO, H.E.M.C. **Effect of caffeine on larval mortality of *Aedes aegypti*: Efficiency related to solution concentration and age.** . Journal of Entomological Research 34(1): 11-21, 2010.

GUZMÁN, M.G. e KOURÍ, G. **Dengue: un update.** Lancet Infectious Diseases 2: 33-42, 2002.

HECK, C.I. e DE MEJIA, E.G. **Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations.** Journal of Food Science 72(9): R138-151, 2007.

HENAO, G.J.P., PAJÓN, C.M.G. e TORRES, J.M.C. **Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia.** Revista CES MEDICINA 21(1): 47-54, 2007.

HOTCHKIN, P.G. **The duration of larval life of *Aedes aegypti* as affected by time of hatch.** Journal of the American Mosquito Control Association 1(4): 489-492, 1985.

INGKANINAN, K., TEMKITTHAWON, P., CHUENCHOM, K., *et al.* **Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies.** Journal of Ethnopharmacology 89(2-3): 261-264, 2003.

IVDRJ. **Instituto Virtual da Dengue do Estado do Rio de Janeiro.** Acesso em 08/04/2008, disponível em <http://www.ivdrj.ufrj.br/>.

JACOBS, M. **Viral tropical infections: Dengue.** Medicine 33(7): 18-20, 2005.

JACQUES, R.A., DARIVA, C., DE OLIVEIRA, J.V., *et al.* **Pressurized liquid extraction of mate tea leaves.** *Analytica Chimica Acta* 625(1): 70-76, 2008.

JANSEN, C.C. e BEEBE, N.W. **The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next.** *Microbes and Infection* 12(4): 272-279, 2010.

KOPPENHÖFER, A.M. e FUZY, E.M. ***Steinernema scarabaei* for the control of white grubs.** *Biological Control* 28(1): 47-59, 2003.

KOSSOUOH, C., MOUDACHIROU, M., ADJAKIDJE, V., *et al.* **Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin.** *Journal of Essential Oil Research* 19(4): 307-309, 2007.

KUMAR, C.S.S.R., SRINIVAS, M. e YAKKUNDI, S. **Limonoids from the seeds of *Azadirachta indica*.** *Phytochemistry* 43(2): 451-455, 1996.

LIMA, J.B.P., DA-CUNHA, M.P., DA SILVA JÚNIOR, R.C., *et al.* **Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68(3): 329-333, 2003.

LIMA, N.M.F., DOS SANTOS, A.F., PORFÍRIO, Z., *et al.* **Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*.** *Acta Tropica* 83(1): 43-47, 2002.

LIMA, T.F.O.D., DUARTE, D.A. e SÁ, A.L.B. **Mitocôndria revisada.** *Revista Eletrônica Acervo Saúde* 1: 94-107, 2010.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., VAZEILLE, M., DE FILIPPIS, A.M.B., *et al.* ***Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98(1): 43-54, 2004.

LUNA, J.D., DE CARVALHO, J.M., DE LIMA, M.R.F., *et al.* **Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides.** *Natural Product Research* 20(3): 253-257, 2006.

LUNA, J.D., DOS SANTOS, A.F., DE LIMA, M.R.F., *et al.* **A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology* 97(2): 199-206, 2005.



LUNA, J.E.D., MARTINS, M.F., ANJOS, A.F.D., *et al.* **Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil.** Revista Saúde Pública 38(6), 2004.

MACORIS, M.D.L.D.G., ANDRIGHETTI, M.T.M., OTRERA, V.C.G., *et al.* **Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102(8): 895-900, 2007.

MASSAD, E., COUTINHO, F.A.B., BURATTINI, M.N., *et al.* **The risk of yellow fever in a dengue-infested area.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 95(4): 370-374, 2001.

MCVAY, J.R., GUDAUSKAS, R.T. e HARPER, J.D. **Effects of *Bacillus thuringiensis* Nuclear-Polyhedrosis Virus Mixtures on *Trichoplusia ni* Larvae.** Journal of Invertebrate Pathology 29(3): 367-372, 1977.

MELO-SANTOS, M.A.V., VARJAL-MELO, J.J.M., ARAÚJO, A.P., *et al.* **Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil.** Acta Tropica 113(2): 180-189, 2010.

MEWES, S., KRUGER, H. e PANK, F. **Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (*Thymus vulgaris* L.).** Genetic Resources and Crop Evolution 55(8): 1303-1311, 2008.

MEYER, B.N.F., N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. **Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.** Planta Medica 45(1): 31-34, 1982.

MONATH, T.P. **Yellow fever: an update.** Lancet Infectious Diseases 1: 11-20, 2001.

MOON, D.-O., CHOI, Y.H., KIM, N.-D., *et al.* **Anti-inflammatory effects of [beta]-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia.** International Immunopharmacology 7(4): 506-514, 2007.

MORALES-RODRIGUEZ, A. e PECK, D.C. **Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*.** Biological Control 51(1): 169-180, 2009.

MORALES, C.A., GONZÁLEZ, R. e ARAGÓN, R. **Evaluación de la actividad larvicida de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae).** Rev Colomb Entomol 30(2): 187-192, 2004.

MYERS, D. **Bronchodilators**. Journal of Exotic Pet Medicine 16(4): 267-269, 2007.

NAKORNCHAI, S. e KONTHIANG, P. **Activity of azithromycin or erythromycin in combination with antimalarial drugs against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro**. Acta Tropica 100(3): 185-191, 2006.

OCAMPO, C.B., SALAZAR-TERREROS, M.J., MINA, N.J., *et al.* **Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia**. Acta Tropica 118(1): 37-44, 2011.

OMS. **Países e áreas de risco de transmissão da dengue, 2006**. Acesso em 31/07/2009, disponível em <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>.

PAHO. **A timeline for dengue in the americas to december 31, 2000 and noted first occurences**. Acesso em 15/04/2011, disponível em [http://www.paho.org/english/hcp/hct/vbd/dengue\\_history.htm](http://www.paho.org/english/hcp/hct/vbd/dengue_history.htm)

PAIXÃO, A. **Ministério da Saúde divulga novos dados sobre a dengue no país**. Acesso em 15/04/2011, disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=12305](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=12305).

PAIXÃO, A. **Mortes por dengue caem 64% no primeiro trimestre do ano**. Acesso em 15/04/2011, disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=12395](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=12395)

PARK, B.-S., LEE, H.-K., LEE, S.-E., *et al.* **Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori***. Journal of Ethnopharmacology 105(1-2): 255-262, 2006.

PARK, K., LEE, S.-G., SHIN, S.-C., *et al.* **Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(7): 1866-1870, 2002.

PARRY, T.J., THYAGARAJAN, R., ARGENTIERI, D., *et al.* **Effects of drug combinations on smooth muscle cell proliferation: An isobolographic analysis**. European Journal of Pharmacology 532(1-2): 38-43, 2006.

PISUTTHANAN, S., PLIANBANGCHANG, P., PISUTTHANAN, N., *et al.* **Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae.** Naresuan University Journal 12(2): 13-18, 2004.

PROPHIRO, J.S. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e atividade inseticida de produtos de origem botânica.** Curitiba/PR, Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado - Pós Graduação em Ciências Biológicas: 122,2008.

RIBEIRO, T.S., FREIRE-DE-LIMA, L., PREVIATO, J.O., *et al.* **Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14(13): 3555-3558, 2004.

RODRIGUES, A.M.S., DE PAULA, J.E., ROBLLOT, F., *et al.* **Larvicidal activity of *Cydistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae.** Fitoterapia 76(7-8): 755-757, 2005.

ROJAS, I., SANTIAGO, R., ARVIZU, G., *et al.* **Análisis químico y biológico preliminar de las semillas de *Annona muricata* L. (Annonaceae).** INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA MULTIDISCIPLINARIA 3(3): 7-12, 2004.

SACAU, E.P., ESTÉVEZ-BRAUN, A., RAVELO, Á.G., *et al.* **Inhibitory effects of lapachol derivatives on epstein-barr virus activation.** Bioorganic & Medicinal Chemistry 11(4): 483-488, 2003.

SANTORO, G.F., CARDOSO, M.D.G., GUIMARAES, L.G.L., *et al.* **Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa : Kinetoplastida) growth and ultrastructure.** Parasitology Research 100(4): 783-790, 2007.

SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. e FARIA, A.R. **Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.** Revista Brasileira de Farmacognosia 17: 455-465, 2007.

SCHUBERT, A., ZANIN, F.F., PEREIRA, D.F., *et al.* **Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (ervamate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul.** Química Nova 29(6): 1233-1236, 2006.

SCOTT, I., JENSEN, H., PHILOGÈNE, B., *et al.* **A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action.** Phytochemistry Reviews 7(1): 65-75, 2008.

SCOTT, I.M., JENSEN, H., SCOTT, J.G., *et al.* **Botanical insecticides for controlling agricultural pests: piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae).** Archives of Insect Biochemistry and Physiology 54: 212-225, 2003.

SILVA, T.M.S., CAMARA, C.A., BARBOSA, T.P., *et al.* **Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives.** Bioorganic & Medicinal Chemistry 13(1): 193-196, 2005.

SIMAS, N.K., LIMA, E.D.C., KUSTER, R.M., *et al.* **Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40(4): 405-407, 2007.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SRIVASTAVA, S.D. **Limonoids from the seeds of *Melia azedarach*.** Journal of Natural Products 49(1): 56-61, 1986.

STEINERT, J., KHALAF, H. e RIMPLER, M. **HPLC separation and determination of naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae).** Journal of Chromatography A 693(2): 281-287, 1995.

STRASSMANN, B.B., VIEIRA, A.R., PEDROTTI, E.L., *et al.* **Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(18): 8348-8353, 2008.

STREIT, N.M., HECKTHEUER, L.H.R., DO CANTO, M.W., *et al.* **Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*).** Food Chemistry(102): 560-564, 2007.

STUMPF, C.F., COMINS, D.L., SPARKS, T.C., *et al.* **Insecticidal activity and mode of action of novel nicotinoids synthesized by new acylpyridinium salt chemistry and directed lithiation.** Pesticide Biochemistry and Physiology 87(3): 211-219, 2007.

TALLARIDA, R.J. e RAFFA, R.B. **Testing for synergism over a range of fixed ratio drug combinations: Replacing the isobologram.** Life Sciences 58(2): PL23-PL28, 1995.

THOMULKA, K.W. e LANGE, J.H. **Mixture toxicity of nitrobenzene and trinitrobenzene using the marine bacterium *Vibrio harveyas* the test organism.** Ecotoxicology and Environmental Safety 36(2): 189-195, 1997.

TWARDOWSCHY, A., FREITAS, C.S., BAGGIO, C.H., *et al.* **Antiulcerogenic activity of bark extract of *Tabebuia avellanedae*, Lorentz ex Griseb.** Journal of Ethnopharmacology 118(3): 455-459, 2008.

URDANETA-MARQUEZ, L. e FAILLOUX, A.-B. **Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses.** Infection, Genetics and Evolution 11(2): 253-261, 2011.

VINAYAGAM, A., SENTHILKULMAR, N. e UMAMAHESWARI, A. **Larvicidal activity of some medicinal plant extracts against malaria vector *Anopheles stephensi*.** Research Journal Parasitology 3(2): 50-58, 2008.

WANDSCHEER, C.B., DUQUE, J.E., SILVA, M.A.N.D., *et al.* **Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*.** Toxicon 44: 829-835, 2004.

WHO. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**

WIKIPEDIA. Acesso em 20/08/2011, disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Mosquito>.

YAMASHITA, M., KANEKO, M., IIDA, A., *et al.* **Stereoselective synthesis and cytotoxicity of a cancer chemopreventive naphthoquinone from *Tabebuia avellanedae*.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17(23): 6417-6420, 2007.

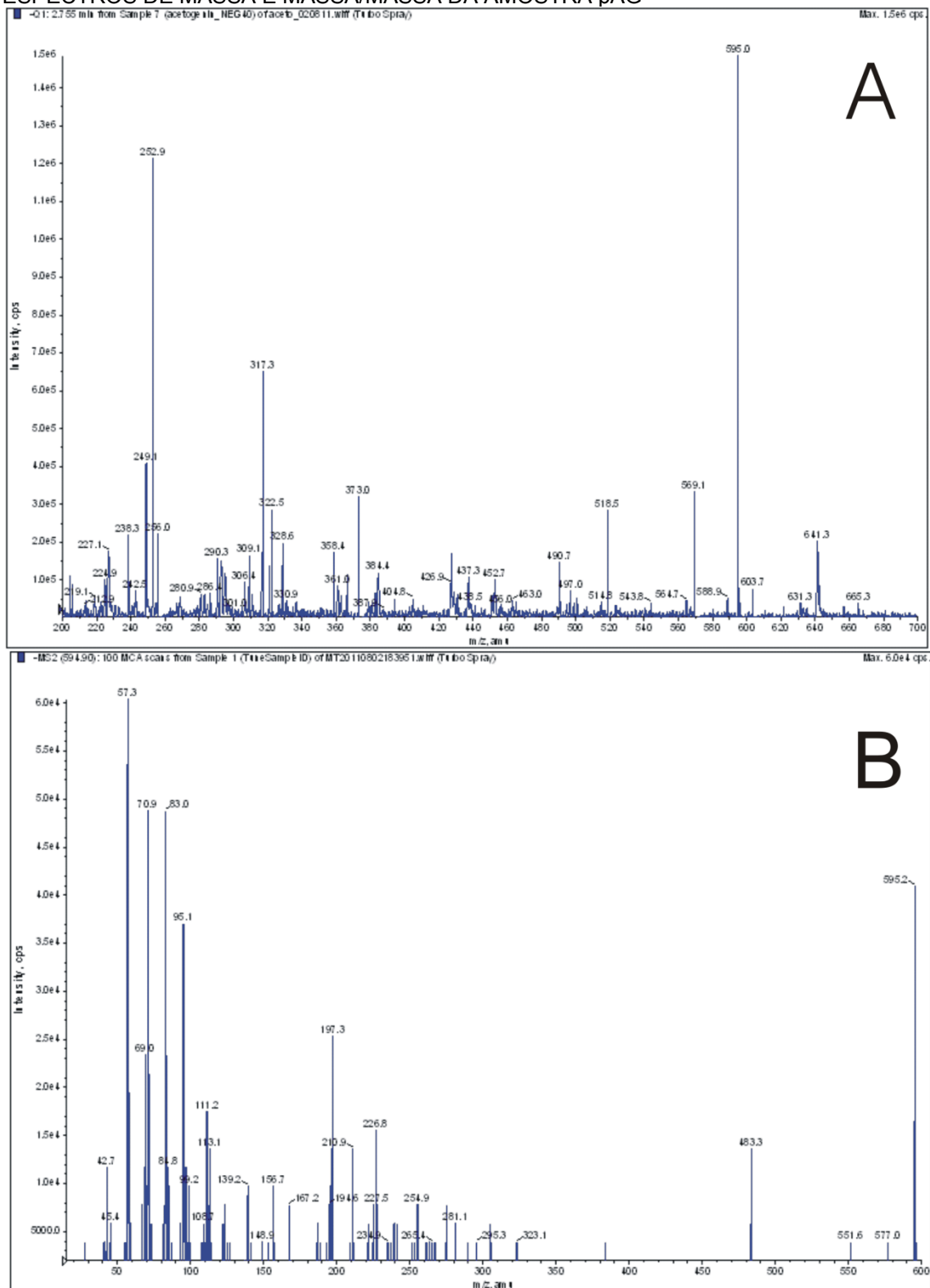
ZHENG, X.-Q., KOYAMA, Y., NAGAI, C., *et al.* **Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits.** Journal of Plant Physiology 161(4): 363-369, 2004.

## ANEXOS

ANEXO 1 - ESPECTROS DE MASSA E MASSA/MASSA DA AMOSTRA pAG.....	139
ANEXO 2 - CONCENTRAÇÕES LETAIS EM NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> DO CONTROLE POSITIVO TIMOL.....	140
ANEXO 3 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PIPERINA EM. ESPECTROFOTÔMETRO A 343 nm.....	141
ANEXO 4 – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE ....	142

## ANEXO 1

### ESPECTROS DE MASSA E MASSA/MASSA DA AMOSTRA pAG



NOTA: (A) Espectro de massa da amostra pAG; (B) Espectro de massa/massa do pico 595

## ANEXO 2

### CONCENTRAÇÕES LETAIS EM NÁUPLIOS DE *Artemia salina* DO CONTROLE POSITIVO TIMOL

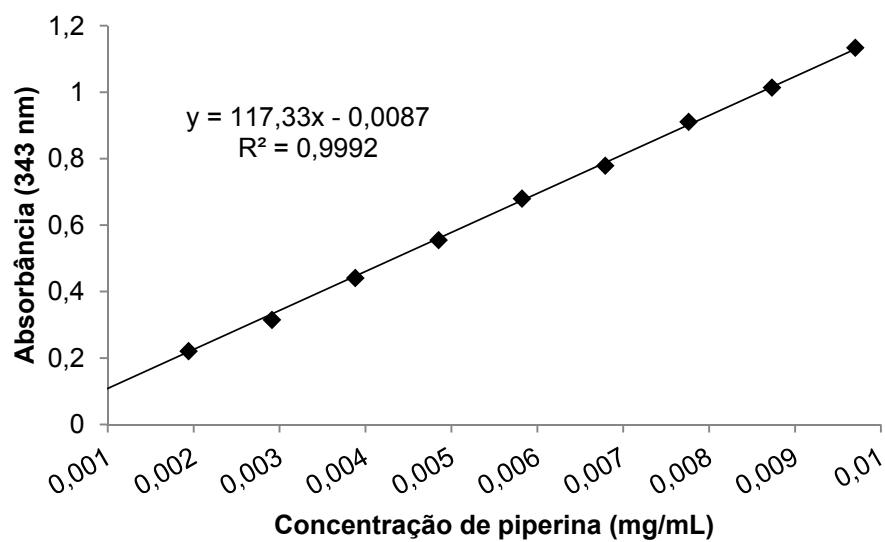
	Timol
<b>CL<sub>2</sub></b>	12,07 (10,82-13,18)
<b>CL<sub>10</sub></b>	15,30 (14,12-16,34)
<b>CL<sub>25</sub></b>	18,43 (17,35-19,41)
<b>CL<sub>50</sub></b>	22,67 (21,64-23,69)
<b>CL<sub>90</sub></b>	33,58 (31,76-35,88)
<b>CL<sub>95</sub></b>	37,54 (35,20-40,60)
<b>CL<sub>99</sub></b>	46,27 (42,57-51,34)
<b><math>\chi^2</math></b>	6,51

NOTA: Curva dose-resposta com sete concentrações diferentes com n=40; os valores entre parêntesis representam o intervalo de confiança determinado pelo método PROBIT com 95 % de confiança; controle negativo = etanol (2 % v/v) com 0 % de mortalidade.





### ANEXO 3

CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PIPERINA EM ESPECTROFOTÔMETRO A 343 nm



NOTA: Padrão com 97% de pureza

## ANEXO 4

< Uso exclusivo do INPI >	
 <p style="font-size: small;">INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL</p> <p>patenteiro 015110002445 07/11/2011 16:22 DEPR</p>  <p style="font-size: small;">0000221109573019</p>	<p style="text-align: center; font-size: small;">Espaço para etiqueta</p>

### DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: Universidade Federal do Paraná
- 1.2 Qualificação: Autarquia Federal
- 1.3 CNPJ/CPF: 75095679000149
- 1.4 Endereço Completo: Rua XV de Novembro, 695 Curitiba/PR
- 1.5 CEP: 80020-310      1.6 Telefone: 41 3310-2699      1.7 Fax: 41 3310-2760
- 1.8 E-mail: inovacao@ufpr.br

☐ continua em folha anexa

**2. Natureza:**      ☒ Invenção      ☐ Modelo de Utilidade      ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**

COMPOSIÇÕES FITOPRAGUICIDAS SINÉRGICAS A PARTIR DA COMBINAÇÃO DE EXTRATOS DE ANNONACEAE E PIPERACEAE E PROCESSOS DE UTILIZAÇÃO CONTRA Aedes aegypti E OUTRAS PRAGAS

☐ continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão:**      do pedido Nº      Data de Depósito:

**5. Prioridade:**      ☐ interna      ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

**6. Inventor (72):**

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: José Domingos Pontana
- 6.2 Qualificação: Doutor      6.3 CPF: 027.761.039-72
- 6.4 Endereço completo: Rua Epitácio Pessoa, 345 Tarumã Curitiba/PR
- 6.5 CEP: 82530-270      6.6 Telefone: 41 9924-2999      6.7 Fax:
- 6.8 E-Mail: anatonof2011@gmail.com

☒ continua em folha anexa



*[Assinatura]*

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):  
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
- ☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- ☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- ☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):  
(Deverá ser indicado o n° total de somente uma das vias de cada documento)

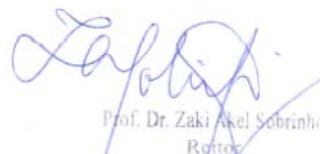
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	2 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	37 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	4 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) DOU, Declaração de divulgação anterior, complemento (figura), Anexo 1.01				9 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 53 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

CURUAGA 07/11/11

Local e Data

  
Prof. Dr. Zaki Akel Sobrinho  
Reitor

Assinatura e Carimbo

## ANEXO DE CONTINUAÇÃO – FORMULÁRIO 1.01

---

### 1. Inventor (72):

- ☒ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)  
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Adelia Grzybowski

CPF: 033.343.079-48

Qualificação: Mestre em Ciências Farmacêuticas

Endereço: Rua Governador Agamenon Magalhães, 173, apto 1405-A – Bairro: Cristo Rei – Curitiba-PR

CEP: 80050-510

Telefone: (41) 8412-6820

E-mail: adeliagrz@yahoo.com.br

---

### 2. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)  
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Marcela Tiboni

CPF: 049.760.209-16

Qualificação: Mestre em Ciências Farmacêuticas

Endereço: Rua do Herval, 300, apto 23 – Bairro: Alto da XV – Curitiba - PR

CEP: 80.045-010

Telefone: (41) 8442-0827

E-mail: ma.tiboni@gmail.com

---

### 3. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)  
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Maurício Passos

CPF: 566.456.869-00

Qualificação: Doutor em Processos Biotecnológicos

Endereço: Rua Coronel Ottoni Maciel, 490, apto 503 – Bairro: Vila Isabel – Curitiba - PR

CEP: 80320-00

Telefone: (41) 3075-0235

E-mail: mpassos23@gmail.com

---

### 4. Inventor (72):

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)  
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Mario Antonio Navarro da Silva

CPF: 577.903.129-72

Qualificação: Doutor em Entomologia

Endereço: Rua Martin Afonso 2915, apto 63 - Campina do Siqueira – Curitiba-PR

CEP: 80710-030



Telefone: (41) 9981-0353  
E-mail: mnavarro@ufpr.br

---

**5. Inventor (72):**

- ☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)  
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: Rodrigo Faixa Chitolina

CPF: 074.132.159-93

Qualificação: Graduando em Ciências Biológicas

Endereço: Rua Maranhão 1931, apto. 302 - Bloco 2 - Bairro Portão – Curitiba-PR

CEP: 80.610-001

Telefone: (41) 3361-1640

E-mail: rfchitolina@gmail.com

---

